

*Alma Mater Studiorum – Università di Bologna*

**DOTTORATO DI RICERCA IN**  
**SCIENZE FARMACOLOGICHE E TOSSICOLOGICHE, DELLO SVILUPPO E DEL**  
**MOVIMENTO UMANO**

**Ciclo XXVII**

**Settore Concorsuale di afferenza: 05/H2 – ISTOLOGIA**

**Settore Scientifico Disciplinare: BIO/17 – ISTOLOGIA**

**TITOLO TESI**

**STUDIO DEL POSSIBILE RUOLO DEL COMPLESSO POLYCOMB**  
**NEL DETERMINARE LA SCHISI DEL LABBRO E DEL PALATO**

Presentata da: **Dott.ssa FRANCESCA CURA**

Coordinatore Dottorato

**Prof.ssa PATRIZIA HRELIA**

Relatore

**Dr. LUCA SCAPOLI**

Esame finale anno 2015

# INDICE

<b>1. <u>INTRODUZIONE</u></b>	<b>1</b>
1.1 EMBRIOLOGIA OROFACCIALE	2
1.2 CLASSIFICAZIONE DELLE SCHISI OROFACCIALI	5
1.2.1 Labioschisi con o senza palatoschisi	6
1.2.2 Schisi del solo palato	6
1.3 EPIDEMIOLOGIA DELLE SCHISI	7
1.4 ALTERAZIONE DELLO SVILUPPO	8
1.4.1 FATTORI DI RISCHIO AMBIENTALI	8
1.4.1.1 Farmaci	8
1.4.1.2 Alcool	9
1.4.1.3 Fumo	10
1.4.1.4 Multivitaminici	10
1.4.2 FATTORI DI RISCHIO GENETICO	12
<b>2. <u>SCOPO DELLA RICERCA</u></b>	<b>18</b>
<b>3. <u>MATERIALI E METODI</u></b>	<b>22</b>
3.1 Popolazione di studio	23
3.2 Estrazione del DNA genomico	24
3.3 Quantificazione del DNA	25
3.4 Selezione dei polimorfismi	26
3.5 GENOTIPIZZAZIONE	27
3.5.1 Real-Time PCR (TaqMan)	27
3.5.2 Piattaforma Sequenom®	29
3.6 ANALISI STATISTICA	35
3.6.1 Equilibrio di Hardy-Weinberg	35
3.6.2 Transmission Disequilibrium Test (TDT)	36
3.6.3 Rapporto crociato di rischio: Odd Ratio (OR)	37

<b>4. <u>RISULTATI E DISCUSSIONE</u></b> .....	39
<b>4.1 STUDIO DI GENI COINVOLTI NELLA VIA METABOLICA DELL'ACIDO FOLICO</b> .....	40
4.1.1 RFC1 .....	42
4.1.2 DHFR .....	44
<b>4.2 ANALISI GENETICA DI 15 <i>LOCI</i> DI RISCHIO PER LA NSCL/P</b> .....	47
<b>4.3 STUDIO DEL RUOLO DEL COMPLESSO POLYCOMB NEL DETERMINARE LA NSCL/P</b> .....	52
4.3.1 JARID2 .....	53
4.3.2 Il complesso Polycomb .....	54
<b>5. <u>SOMMARIO</u></b> .....	65
<b>6. <u>BIBLIOGRAFIA</u></b> .....	69
<b>7. <u>PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE</u></b> .....	80

**ABSTRACT**

La labioschisi con o senza palatoschisi non-sindromica (NSCL/P) è tra le più frequenti alterazioni dello sviluppo embrionale, causata dall'interazione di fattori genetici e ambientali, moti dei quali ancora ignoti.

L'obiettivo del mio progetto di Dottorato consiste nell'identificazione di fattori di rischio genetico in un processo a due stadi che prevede la selezione di geni candidati e la verifica del loro coinvolgimento nella determinazione della malformazione mediante studi di associazione.

Ho analizzato alcuni polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) dei geni RFC1 e DHFR, appartenenti alla via metabolica dell'acido folico, evidenziando una debole associazione tra alcuni degli SNPs indagati e la NSCL/P nella popolazione italiana.

Presso il laboratorio della Dott.ssa Mangold dell'Università di Bonn, ho valutato il ruolo di 15 diverse regioni cromosomiche nel determinare la suscettibilità alla malattia, evidenziando una significativa associazione per i marcatori localizzati in 8q24 e 1p22.

Ho quindi rivolto la mia attenzione al ruolo del complesso Polycomb nell'insorgenza della schisi. Nell'uomo i due complessi Polycomb, PRC1 e PRC2, rimodellano la cromatina agendo da regolatori dei meccanismi trascrizionali alla base della differenziazione cellulare e dello sviluppo embrionale.

Ho ipotizzato che mutazioni a carico di geni appartenenti a PRC2 possano essere considerati potenziali fattori di rischio genetico nel determinare la NSCL/P. Il razionale consiste nel fatto che JARID2, una proteina che interagisce con PRC2, è associata all'insorgenza della NSCL/P ed espressa a livello delle cellule epiteliali delle lamine palatine che si approssimano alla fusione.

L'indagine condotta analizzando i geni di elementi o partner dei due complessi Polycomb, ha evidenziato un'associazione significativa con alcuni polimorfismi dei geni indagati, associazione ulteriormente confermata dall'analisi degli aplotipi.

Le analisi condotte sui geni candidati mi hanno permesso di raccogliere dati interessanti sull'eziologia della malformazione. Studi indipendenti saranno necessari per poter validare l'associazione tra le varianti genetiche di questi geni candidati e la NSCL/P.

# *1. INTRODUZIONE*

Le schisi orofacciali (OFCs) sono malformazioni congenite che coinvolgono la cavità orale. Si tratta di difetti che colpiscono radicalmente l'estetica e la funzionalità del volto che hanno importanti ricadute sugli aspetti medici, sociali e psicologici per la persona affetta e per la sua famiglia. Le difficoltà legate alla condizione morbosa, dovute soprattutto a problemi di alimentazione, di linguaggio, di udito, oltre a problemi di tipo estetico e psicologici conseguenti, richiedono un complesso programma assistenziale multidisciplinari, protratto fino all'età adulta.

Studi epidemiologici e genetici suggeriscono che le OFCs abbiano un'eziologia multifattoriale, dove predisposizione genetica, esposizione ambientale e fattori sociali, giocano un ruolo chiave nella manifestazione del fenotipo malato (Prescott and Malcolm, 2002; Dixon, et al., 2011).

Da quanto finora esposto si comprende l'importanza degli studi genetici volti al fine di diagnosticare le diverse forme di OFCs e fornire al paziente e alla famiglia la corretta consulenza genetica ed attuare un'efficace azione di prevenzione.

## 1.1 EMBRIOLOGIA OROFACCIALE

Il normale sviluppo della faccia (Figura 1) richiede una serie complessa di eventi coordinati di migrazione, proliferazione, differenziazione cellulare ed apoptosi.

Il tutto ha inizio intorno alla quarta settimana di sviluppo embrionale (Mossey, et al., 2009) a partire da cinque processi mesodermici detti *processi facciali* che compaiono sulle pareti della *bocca primitiva o stomodeo*.

I cinque *processi facciali* si dividono in:

- a) processo frontale: è il più voluminoso, determinato dalla sporgenza del telencefalo e forma il tetto dello stomodeo (posizione cefalica);
- b) due processi mascellari simmetrici: sono propaggini dei processi mandibolari che costituiscono le pareti laterali dello stomodeo;
- c) due processi mandibolari simmetrici che si uniscono lungo la linea mediana per formare il pavimento dello stomodeo (posizione caudale).

I processi facciali, dalla quarta all'ottava settimana di sviluppo, sono sottoposti ad una serie di movimenti morfogenetici che ne cambiano la forma e le dimensioni fino a fondersi in regioni prestabilite dando origine alla struttura definitiva della faccia.

Alla fine della quarta settimana, da ciascun lato del processo frontale si differenziano due ispessimenti ectodermici simmetrici: i *placodi olfattivi*. Inoltre, i due processi mandibolari si fondono medialmente dando origine al mento ed all'abbozzo del labbro inferiore. Durante la

quinta settimana, il mesoderma che circonda ognuno di essi, prolifera dando luogo a due abbozzi contigui a forma di ferro di cavallo: i *processi nasali mediali e laterali*. La formazione dei processi nasali trasforma i *placodi olfattivi* in fossette olfattive, che si aprono all'esterno con le narici.

Durante la sesta settimana i processi mascellari crescono obliquamente verso il basso da ciascun lato della lingua, originando i *processi palatini*.

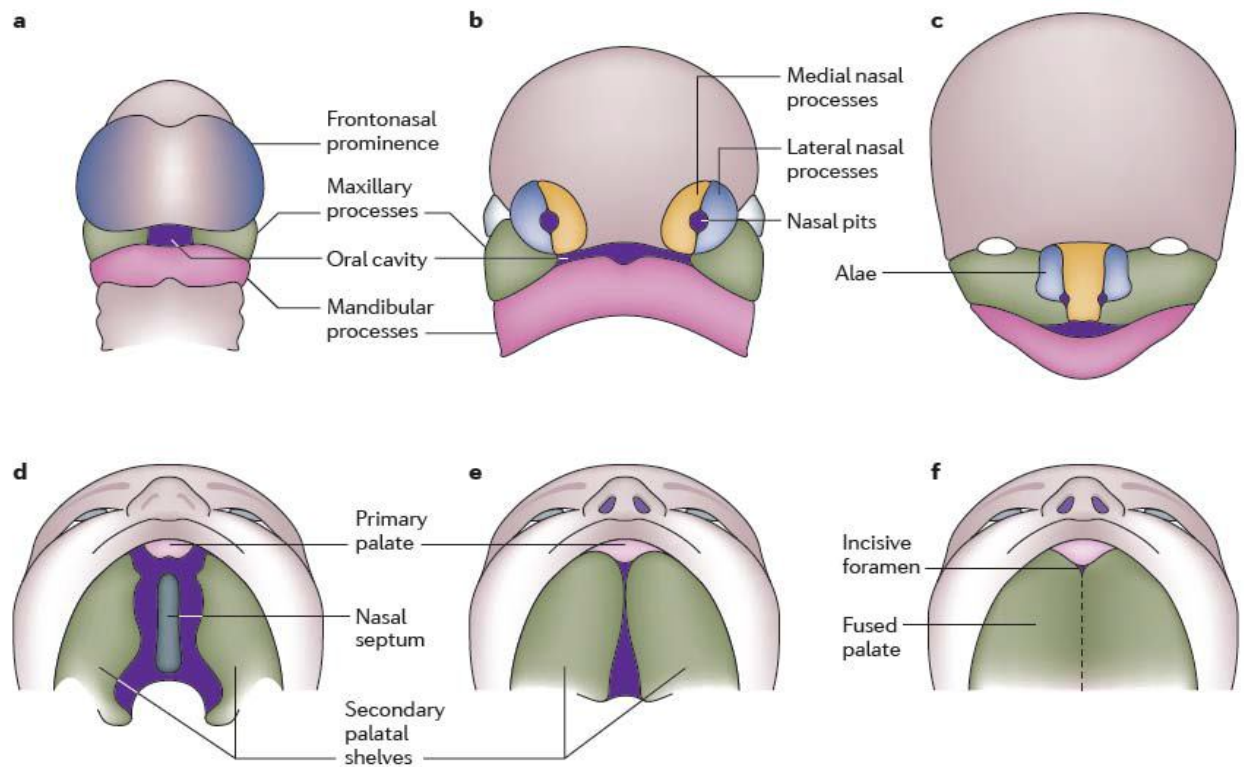
Alla fine della sesta settimana, i processi nasali mediali migrano verso il centro, dando origine al *massiccio mediano*. Dalla parte superiore di questo si forma il *setto nasale*, da quella inferiore, il *processo intermascellare* che comprende le seguenti strutture:

- una componente labiale, che forma il filtro ed il tubercolo del labbro superiore;
- una porzione premascellare della mascella, dalla quale eromperanno i quattro denti incisivi;
- una componente palatina, che formerà il palato primario.

I processi mascellari si fondono anteriormente con il processo intermascellare, dando origine all'*arco della mascella* ed al *labbro superiore*. Successivamente, i bordi superiori dei processi mascellari si uniscono ai processi naso-laterali, formando i *massicci laterali* (le strutture di base delle guance). In profondità, tale fusione è incompleta e ad entrambi i lati del naso resta un canale pervio, il *dotto naso-lacrimale*, che collega il futuro sacco lacrimale dell'occhio alla cavità nasale.

Tra la settima e la nona settimana di sviluppo embrionale, l'abbozzo della lingua migra verso il basso ed i processi palatini cambiano direzione migrando uno verso l'altro su un piano orizzontale.

Alla decima settimana, i processi palatini si fondono tra loro, con il palato primitivo e con il setto nasale, a formare il *palato secondario* (Mossey, et al., 2009). Al centro del palato secondario resta visibile la linea di fusione dei processi palatini che prende il nome di *rafe mediano*, mentre il punto d'incontro sulla linea mediana tra il palato primario ed il secondario delimita una piccola cavità detta *forame incisivo*. Il palato primitivo e la porzione anteriore del palato secondario, in seguito a processi di ossificazione membranosa, danno origine al *palato duro*, al contrario, la porzione posteriore del palato secondario non si ossifica e forma il *palato molle* e l'*ugola*.



**Figura 1. Sviluppo embrionale del labbro e del palato.**

- Alla IV settimana di sviluppo embrionale, la cavità orale primitiva è circondata dal processo frontale (in alto), due processi mascellari (ai lati) e due processi mandibolari (in basso).
- Alla fine della IV settimana, gli ispessimenti ectodermici formano i placodi nasali e contribuiscono alla divisione delle prominenze fronto-nasali in mediali e laterali.
- All'inizio della VI settimana, i margini dei processi nasali mediali di destra e sinistra si fondono tra loro e con i processi mascellari bilaterali per formare il palato primario ed il labbro superiore. Allo stesso tempo, i processi mandibolari confluiscono sulla linea mediana formando il labbro inferiore e la mascella.
- Sempre nella VI settimana, i processi palatini cominciano a crescere verticalmente verso il basso lungo i lati della lingua.
- Nella VII settimana, la lingua si accresce verso il basso mentre i processi palatini ruotano e migrano l'uno verso l'altro su un piano orizzontale.
- La completa fusione del palato separa la cavità orale dalla nasale e il forame incisivo delinea il punto d'incontro tra il palato primario ed il secondario (Dixon, et al., 2011).



## 1.2 CLASSIFICAZIONE DELLE SCHISI OROFACCIALI

Lo sviluppo craniofacciale è un processo altamente complesso. E' pertanto facile comprendere come qualsiasi alterazione del normale processo di migrazione, differenziazione e regolazione cellulare durante l'embriogenesi possa portare all'insorgenza di anomalie alla nascita (Nuckolls, et al., 1999).

Le schisi di labbro e palato primario presentano una base eziologica diversa rispetto alle schisi del solo palato secondario. Per questa ragione è possibile suddividere le schisi orofacciali in:

- labioschisi con o senza palatoschisi (Cleft Lip with or without cleft Palate, LPS o CL/P) che colpisce il labbro superiore, eventualmente il processo alveolare e può estendersi anche a palato duro, palato molle ed ugola;
- schisi del solo palato (Ceft Palate Only, PS o CPO), che comprende solo quelle strutture derivate dal palato secondario (palato duro, palato molle ed ugola) (Mossey, et al., 2009).

Altra distinzione può essere fatta sulla base della presenza o meno di altre malformazioni nel neonato che esibisce la schisi. È possibile osservare schisi orofacciali isolate oppure schisi orofacciali accompagnate da altre malformazioni.

Nell'ambito del secondo gruppo, si possono distinguere eziologicamente:

1. schisi orofacciali legate a sindromi monogeniche:
  - ◆ Sindrome di Van der Woude (VWS): è una patologia ad eredità autosomica dominante causata da mutazioni sul gene IRF6 (Fattore di regolazione dell'interferone 6); è caratterizzata da fistole o fossette sul labbro inferiore e schisi del labbro superiore e/o schisi del palato.
  - ◆ Sindrome Popliteale del Pterygium (PPS): causata anch'essa da mutazioni sul gene IRF6; presenta, oltre alle malformazioni orofacciali, deformazioni degli arti e dei genitali.
  - ◆ Displasia ectodermica: è una sindrome causata da mutazioni a carico del gene che codifica per il recettore di herpesvirus/molecola di adesione cellulare PVRL1. Presenta schisi orofacciale, sindattilia e displasia ectodermica.

In realtà vi sono moltissime sindromi, circa 300, associate alle schisi labiali e 400 associate alle schisi palatine secondo quanto riportato dalla banca dati Online Mendelian Hineritace in Man ([www.ncbi.nlm.nih.gov/omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim)).

2. Schisi orofacciali legate a sindromi cromosomiche come la trisomia 13 e 18 o la delezione in 22q11.2.

3. Schisi orofacciali associate ad altre mutazioni ad eziologia sconosciuta (Multiple Congenital Anomaly, MCA).

Clinicamente, quando la schisi compare in associazione ad altre malformazioni in un quadro eziologico conosciuto e riconducibile ad una sola causa, è classificata come *sindromica* (Syndromic Cleft Lip with or without cleft Palate, SCL/P). Se invece appare isolata o non riconducibile ad una sindrome è definita *non sindromica* (Non-Syndromic Cleft Lip with or without cleft Palate, NSCL/P) (Wong and Hagg, 2004).

Questa classificazione è fondamentale negli studi di associazione in quanto le schisi sindromiche sono tendenzialmente malattie mendeliane, mentre quelle non sindromiche sono patologie complesse, ad eziologia multifattoriale, in cui sono coinvolti sia fattori genetici che ambientali (Cobourne, 2004).

### 1.2.1 Labioschisi con o senza palatoschisi

La *labioschisi* (LS) o “labbro leporino” (Figura 2), è una malformazione congenita piuttosto comune, dovuta ad una mancata fusione delle componenti cutanee mascellari e mucose del labbro superiore durante la vita intrauterina. Può associarsi alla schisi della gengiva (bordo alveolare) ed è quindi conosciuta come *cheilognatoschisi*.

La LS può essere uni o bilaterale a seconda che interessi un solo lato della faccia o entrambi. Inoltre, può manifestarsi in maniera incompleta o completa. Nel primo caso, la schisi non attraversa la gengiva, nel secondo, va dalle narici al forame incisivo (Bender, 2000).

La labioschisi può accompagnarsi alla palatoschisi ed in questo caso si parla di *labiopalatoschisi* (LPS) o *cheilognatopalatoschisi*. In questo caso, la fessurazione interessa, oltre al labbro, al processo alveolare all’osso mascellare, anche il palato duro e molle. Anche questa forma può presentarsi in forma mono o bilaterale (Dixon, et al., 2011).

### 1.2.2 Schisi del solo palato

La *palatoschisi* (PS) (Figura 2) è una malformazione congenita che interessa solo il palato senza intaccare il labbro o l’arcata gengivale superiore.

Può presentarsi sotto forma di schisi del palato duro e molle o del solo palato molle; nel primo caso può coinvolgere il forame incisivo e si parla di palatoschisi completa, nel secondo caso, invece, si parla di palatoschisi incompleta.

Anch’essa può presentarsi in forma uni o bilaterale. Se la fessurazione si manifesta su un solo lato della faccia, si ha palatoschisi totale monolaterale; al contrario, se interessa

entrambi i lati del volto, si parla di palatoschisi totale bilaterale, più comunemente nota come “gola di lupo” (Dixon, et al., 2011).



**Figura 2. Variabilità fenotipica delle schisi orofacciali:** (A) Schisi unilaterale incompleta del labbro; (B) schisi unilaterale di labbro, alveolo e palato; (C) schisi bilaterale di labbro, alveolo e palato; (D) palatoschisi isolata (Stoll, et al., 2004).

### 1.3 EPIDEMIOLOGIA DELLE SCHISI

Le schisi orofacciali presentano un'incidenza mondiale di circa 1 su 700 nati vivi (Mossey, et al., 2009). Il più alto tasso di prevalenza si riscontra negli Indiani d'America (36/10.000 nati) e nelle popolazioni asiatiche, con maggiore incidenza nei Giapponesi (21/10.000 nati) e nei Cinesi (17/10.000). Al contrario, le popolazioni africane hanno un tasso di prevalenza relativamente basso, intorno a 3/10.000 nati (Lidral and Moreno, 2005).

L'alto tasso di variabilità riscontrato nei diversi gruppi etnici, può essere riconducibile al fatto che la malformazione sia correlata al complesso poligenico che regola l'ampiezza del volto. Questo potrebbe confermare la maggiore influenza dei fattori genetici rispetto ai fattori ambientali nell'eziopatogenesi della schisi, come testimonia il fatto che gruppi etnici diversi, che condividono la stessa area geografica, sottoposti alle stesse influenze ambientali, presentino una diversa suscettibilità alla patologia.

La labiopalatoschisi si presenta con maggiore incidenza nel sesso maschile rispetto a quello femminile con un rapporto di 2:1; infatti, più grave è il difetto, maggiore è la proporzione di maschi affetti. Questa differenza potrebbe essere riconducibile al fatto che le lamine palatine passano dalla posizione verticale a quella orizzontale prima negli embrioni maschili e poi in quelli femminili (Mossey, et al., 2009).

In generale, la schisi orofacciale si presenta come forma isolata, ma nel 20% dei casi può presentarsi associata ad altre anomalie congenite (Mossey, et al., 2009). Inoltre, tra le forme non sindromiche, pur essendo più frequenti i casi sporadici, si distingue comunque un 20% di casi in cui è presente ricorrenza familiare, per i quali sembra quindi decisivo il ruolo giocato dai fattori genetici (Stuppia, et al., 2011).

## **1.4 ALTERAZIONE DELLO SVILUPPO**

Come descritto in precedenza, la labiopalatoschisi è una patologia ad eziologia multifattoriale per la quale, ad una predisposizione genetica si sommano fattori ambientali che contribuiscono ad aumentare il rischio o ad aggravare la manifestazione fenotipica.

Di seguito analizzerò più nello specifico sia i fattori di rischio ambientali che quelli di tipo genetico.

### **1.4.1 FATTORI DI RISCHIO AMBIENTALI**

Alcuni fattori esogeni possono avere un effetto teratogeno sul feto se assunti dalla madre tra la quarta e l'ottava settimana di sviluppo intrauterino. A differenza dei fattori genetici, questi possono essere attenuati o eliminati, al fine di ridurre il rischio di insorgenza dell'anomalia.

Di seguito, una breve descrizione dei principali fattori ambientali studiati in relazione alle schisi orofacciali:

#### **1.4.1.1 Farmaci**

##### **○ Steroidi**

I corticosteroidi sono normalmente utilizzati per il trattamento e la cura di diverse patologie delle donne in età fertile, ma sono controindicati nelle donne in gravidanza a causa del loro dimostrato effetto teratogeno sul prodotto del concepimento (Shepard, et al., 2002).

L'impiego di corticosteroidi durante il primo trimestre di gravidanza ha dimostrato avere un'elevata associazione con il rischio di schisi orofacciale (Edwards, et al., 2003; Carmichael, et al., 2007) sia in seguito ad uso sistemico (Pradat, et al., 2003), che topico (Edwards, et al., 2003).

### ○ Anticonvulsivi

I farmaci anticonvulsivanti sono generalmente prescritti per la cura dell'epilessia ma, se assunti durante le prime settimane di gestazione hanno effetto teratogeno sull'embrione aumentando il rischio di difetti congeniti (Feldman, et al., 1977).

Diversi studi hanno dimostrato una forte associazione tra l'insorgenza delle malformazioni orofacciali e l'utilizzo di *Lamotrigina* (Holmes, et al., 2008), *Diazepam* (Safran and Oakley, 1975) e benzodiazepine in generale (Laegreid, et al., 1990). Il nostro gruppo di ricerca ha evidenziato una correlazione tra la subunità  $\beta 3$  del recettore dell'acido gamma amminobutirrico (GABRB3), bersaglio delle benzodiazepine, e l'insorgenza della malformazione (Scapoli, et al., 2002).

### ○ Farmaci anti-infiammatori non steroidei

Tra i farmaci anti-infiammatori non steroidei per eccellenza si ricorda l'*Aspirina* che, come dimostrato da diversi gruppi di ricerca, può avere un effetto teratogeno sul feto; nello specifico, sono stati riscontrati difetti nella chiusura del tubo neurale, gastroschisi, CL/P e CPO (Saxen, 1975; Kozier, et al., 2003; Norgard, et al., 2005). Anche l'uso del farmaco *Naproxene*, se assunto durante le prime settimane di gestazione, aumenta il rischio di schisi orofacciale (Ericson and Kallen, 2001).

### **1.4.1.2 Alcool**

Il consumo di alcool in gravidanza è dannoso per lo sviluppo embrionale perché causa un'anomalia congenita conosciuta come "sindrome fetale da alcool" (SAF), caratterizzata da ritardo nella crescita pre e post-natale, ritardo mentale e importanti anomalie facciali (Ethen, et al., 2009).

Anche se ancora non è chiaro il meccanismo biologico seguito dall'alcool nel provocare la schisi orofacciale, molti studi supportano l'ipotesi che il rischio cresca con l'aumento dei livelli di consumo di alcool materno, soprattutto nel primo trimestre di gravidanza (Munger, et al., 1996; Shaw and Lammer, 1999; Bille, et al., 2007).

Nonostante questi risultati positivi, il ruolo dell'alcool nelle schisi orofacciali resta ancora incerto in quanto, altri studi non ne hanno confermato l'associazione con la malattia (Meyer, et al., 2003). Probabilmente, l'effetto teratogeno può dipendere dalla capacità di metabolizzazione dello stesso sia da parte della madre che del feto (Mossey, et al., 2009; Boyles, et al., 2010).

### 1.4.1.3 Fumo

Il fumo di sigaretta è forse il fattore di rischio ambientale più studiato nelle OFCs a causa dei suoi effetti negativi sulla salute embrionale (Levy, et al., 2013); aumenta il rischio di placenta previa, ipossia e mortalità fetale (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2004).

Lo sviluppo craniofacciale è particolarmente sensibile agli effetti teratogeni del fumo e quindi deve essere attentamente monitorato (Shi, et al., 2007). È stato ampiamente dimostrato sperimentalmente che l'ipossia materna determina un incremento del rischio di CL/P. Il fumo accresce i livelli di monossido di carbonio che, presentando un'elevata affinità per l'emoglobina, determina una riduzione dell'apporto di ossigeno ai tessuti embrionali durante la palatogenesi (Bailey, et al., 1995; Shaw, et al., 1996; Little, et al., 2004a; Little, et al., 2004b; Honein, et al., 2007).

Il fumo è anche in grado di modificare l'espressione di geni candidati a conferire predisposizione alla malattia: ne sono un esempio i geni TGFA, TGFB3 e MSX1. Le varianti alleliche nei figli, associate all'effetto dannoso del fumo, sono in grado di aumentare considerevolmente il rischio del manifestarsi del fenotipo schisato (Shaw, et al., 1996; Romitti, et al., 1999).

Degne di nota sono le variazioni geniche che interessano il gene GSTP1 (glutathione S-transferasi P1), espresso a livello della placenta e coinvolto nella detossificazione del tabacco: mutazioni geniche a suo carico determinano un'alterazione della funzionalità dell'enzima codificato. Lo studio di Krapels e colleghi (Krapels, et al., 2004) ha dimostrato come il genotipo mutato in madri fumatrici aumenti di tre volte il rischio di avere un figlio affetto da labiopalatoschisi non sindromica rispetto a madri non fumatrici con almeno un allele non mutato. Il rischio aumenta di cinque volte quando sia madre che figlio presentano il genotipo mutato.

### 1.4.1.4 Multivitaminici

In diversi studi è stato dimostrato come l'uso di multivitaminici, assunti in gravidanza, sia in grado di ridurre significativamente l'incidenza di CL/P (Conway, 1958; Werler, et al., 1999).

In particolare, la somministrazione di integratori vitaminici nel primo quadrimestre di gravidanza è associata ad una diminuzione del rischio di schisi del 25% (Loffredo, et al., 2001; Jia, et al., 2009). Tra questi integratori, un elevato effetto protettivo è dato

dalla vitamina A, che è in grado di ridurre notevolmente le probabilità di CL/P (Mitchell, et al., 2003).

Diversi studi hanno anche confermato l'importanza dell'assunzione, durante le prime dodici settimane di gestazione, delle vitamine del gruppo B (B6, B9 e B12) (Narukawa, et al., 1988; Krapels, et al., 2004).

#### ○ Vitamina B6 e B12

Le vitamine B6 e B12 sono coinvolte nel metabolismo dell'omocisteina e pertanto possono avere un ruolo importante nella modulazione dell'espressione genica regolando la sintesi e la trascrizione del DNA (Garrow, 1989). Basse concentrazioni di vitamine B6 e B12 nella madre sono associate con un aumentato rischio di schisi orofacciale nella prole (van Rooij, et al., 2003); al contrario, la supplementazione di tali vitamine contribuisce a ridurre il rischio (Krapels, et al., 2004). Importante è anche la funzione dell'acido folico (vitamina B9) che, se assunto, da solo o in combinazione con le vitamine B6 e B12, diminuisce i livelli di omocisteina plasmatica determinando una riduzione del rischio di CL/P (Jacques, et al., 1999).

#### ○ Acido folico

L'acido folico o vitamina B9 non viene prodotto dall'organismo e deve quindi essere assunto con la dieta.

Il folato è fondamentale per la sintesi del DNA, delle proteine e dell'emoglobina; gioca un ruolo importante nel differenziamento dei tessuti embrionali, tant'è che una carenza di folato nei primi mesi di gravidanza, aumenta il rischio d'insorgenza di difetti di chiusura del tubo neurale (NTD), quali spina bifida e anencefalia (Beaudin and Stover, 2009).

La carenza di folato è un importante fattore di suscettibilità nell'insorgenza della labiopalatoschisi (Pezzetti, et al., 2004); aumenta il rischio di parto prematuro, lesioni placentari e ritardo nella crescita intrauterina. Inoltre, l'assunzione di farmaci come barbiturici ed estro-progestinici o l'elevato consumo di alcool possono far aumentare il fabbisogno o ridurre l'assorbimento di tale vitamina. La disponibilità cellulare di acido folico è anche condizionata dalla presenza di specifiche varianti a carico di geni coinvolti nel metabolismo del folato stesso, come il gene MTHFR, i recettori del folato (FOLRs) ed il gene TCN2 (Pezzetti, et al., 2004; Scapoli, et al., 2005a; Martinelli, et al., 2006).

### 1.4.2 FATTORI DI RISCHIO GENETICO

Fogh-Anderson, nel 1942 è stato il primo ricercatore ad ipotizzare l'esistenza di fattori genetici nell'insorgenza della NSCL/P (Fogh-Andersen, 1942). Successivamente studi epidemiologici di popolazione e basati sui gemelli hanno dimostrato la rilevanza della predisposizione genetica alla malformazione.

Nell'ultimo ventennio è stata impiegata un'ampia varietà di approcci molecolari mirati all'identificazione dei fattori di rischio genetico, quali ad esempio, analisi di associazione allelica genome-wide e del gene candidato, analisi di *linkage*, studi di espressione genica in situ e di animali transgenici, ma i risultati sono stati per lo più inconcludenti e spesso contraddittori (Rajion and Alwi, 2007).

La componente genetica alla base dell'insorgenza di quest'anomalia congenita è molto complessa ed eterogenea, con più *loci* e geni coinvolti, denominati appunto OFC (Lidral, et al., 1997). In Tabella 1 sono elencati i *loci*, i geni maggiormente indagati e la loro rispettiva localizzazione cromosomica.

<b>Loci e geni candidati per LPS</b>	<b>Localizzazione cromosomica</b>
OFC1	6p24-p23
OFC2	2p13
OFC3	19q13.2
OFC4	4q21-q31
OFC5 (MSX1)	4q16
OFC6 (IRF6)	1q32.3-q41
OFC7 (PVRL1)	11q23.3
OFC8 (TP73L)	3q28
OFC9	13q33.1-q34
OFC10 (SUMO1)	2q33
OFC11 (BMP4)	14q22.2
OFC12	8q24.31
OFC13	1p33
OFC14	1p31
MTHFR	1p36
TGFB3	14q24
RAR $\alpha$	17q21.1

**Tabella 1.** Loci e geni di suscettibilità per la LPS.



Di seguito è riportata una panoramica della letteratura riguardante i geni maggiormente indagati con l'obiettivo di evidenziare le basi genetiche della schisi orofacciale:

#### ✧ **TGF $\alpha$**

Il gene TGF $\alpha$  (Transforming growth factor alfa) localizzato sul cromosoma 2p13, è stato il primo gene ad essere associato alla LPS (Ardinger, et al., 1989).

TGF $\alpha$  è espresso nel tessuto epiteliale dei processi palatini durante la fusione ed è quindi importante nello sviluppo del palato (Machida, et al., 1999). Diversi studi condotti in differenti popolazioni, hanno evidenziato associazione positiva tra il gene e la malattia (Chenevix-Trench, et al., 1992; Holder, et al., 1992; Sassani, et al., 1993); nello specifico, il mio gruppo di ricerca ha osservato, nell'ambito della labiopalatoschisi non sindromica, un'interazione tra il gene TGF $\alpha$  ed un *locus* in 6p23 (Pezzetti, et al., 1998). Altri gruppi, invece, non hanno confermato tale correlazione (Wyszynski, et al., 1997; Marazita, et al., 2002).

#### ✧ **TGF $\beta$ 3**

Il Transforming growth factor receptor  $\beta$ 3 (TGF $\beta$ 3), al locus 14q22, è coinvolto nella divisione, differenziazione, adesione e morte cellulare. Ha un ruolo ben definito nel normale sviluppo del cuore, del polmone, della mammella e del palato ed ha un chiaro coinvolgimento nella tumorigenesi (Lavery, et al., 2009).

Topi knockout per TGF $\beta$ 3 mostrano palatoschisi causata da un'insufficiente fusione dei processi palatini (Stanier and Moore, 2004). Mutazioni rare mappanti in TGF $\beta$ 3 (Lidral, et al., 1998) e polimorfismi a suo carico, sono stati associati alla NSCL/P in diverse popolazioni (Beaty, et al., 2002; Vieira, et al., 2003; Marazita, et al., 2004). Da uno studio condotto sulla popolazione italiana invece, sono stati ottenuti solo risultati borderline che non ci hanno permesso di attestare con certezza il coinvolgimento di TGF $\beta$ 3 nell'insorgenza delle LPS (Scapoli, et al., 2002).

#### ✧ **MSX1**

MSH homeobox 1 (MSX1) è un repressore trascrizionale, coinvolto nello sviluppo delle strutture craniofacciali.

Topi knockout per MSX1 sviluppano difetti a livello delle ossa nasali, frontali e parietali, agenesia dentale e labiopalatoschisi (Satokata and Maas, 1994).

MSX1 è un fattore necessario per l'espressione delle proteine BMPs (Bone Morphogenetic Proteins - soprattutto BMP4) nel mesenchima palatino e di SHH (Sonic Hedgehog) nel MEE (Medial Edge Epithelium) (Jugessur, et al., 2009).

Studi di *linkage* e *linkage disequilibrium* riportano che le delezioni e le variazioni a carico di questo gene, in particolare se associate a varianti in TGF $\beta$ 3, si traducono in un aumento del rischio di schisi orofacciale (Lidral, et al., 1998; van den Boogaard, et al., 2000).

Studi di interazione hanno portato ad associare MSX1-IRF6 ad agenesia dentale, mentre l'interazione MSX1-TGFB3 è stata associata alla schisi orofacciale (Jugessur, et al., 2003a; Vieira, 2008).

Ad oggi sono state identificate mutazioni a carico di MSX1 in circa il 2% dei pazienti affetti da NSCL/P (Jezewski, et al., 2003; Suzuki, et al., 2004; Vieira, 2008).

### ✧ **IRF6**

L'Interferon regulatory factor 6 (IRF6) appartiene ad una famiglia di nove fattori di trascrizione, con domini di legame al DNA altamente conservati. La maggior parte degli IRFs hanno un ruolo nell'immunitario innato, soprattutto dopo le infezioni virali, ma il ruolo di IRF6 in quest'ambito rimane in gran parte poco chiaro (Kondo, et al., 2002).

IRF6 agisce come soppressore tumorale nelle cellule mammarie (Bailey, et al., 2008) ed induce la differenziazione dei cheratinociti (Biggs, et al., 2012). Mutazioni a suo carico causano due importanti sindromi: la Sindrome di Van der Woude (VWS) causata principalmente da delezioni del gene e la Sindrome Popliteale del Pterygium (PPS), hanno entrambe come malformazione principale la schisi orofacciale (Murray, et al., 1990).

Diversi studi hanno confermato l'associazione tra polimorfismi presenti sul gene e le forme non sindromiche di CL/P (Zuccherro, et al., 2004; Scapoli, et al., 2005b). Rahimov e collaboratori (Rahimov, et al., 2008) hanno dimostrato associazione significativa tra la malattia e lo SNP rs642961 che è in grado di inibire il sito di legame per il fattore di trascrizione AP-2 $\alpha$ .

Questa scoperta che identifica una mutazione causativa e i numerosi studi indipendenti che confermano l'associazione con NSCL/P rendono IRF6 uno dei più significativi fattori di rischio genetico per le schisi non sindromiche.

### ✧ **FOXE1**

Forkhead homeobox protein E1 (FOXE1) è un membro della famiglia dei fattori di trascrizione con dominio a forcina. È espresso a livello del palato embrionale intorno alla settima settimana di gestazione (Trueba, et al., 2005).

Situato sul cromosoma 9q, FOXE1 è stato inizialmente identificato come possibile gene candidato a conferire predisposizione alla schisi labiopalatina attraverso analisi di *linkage* (Marazita, et al., 2004). Analisi di *linkage disequilibrium*, hanno confermato l'associazione di varianti presenti in FOXE1 con NSCL/P e NSCPO (Moreno, et al., 2009). Pazienti con sindrome di Bamforth-Lazarus, presentanti schisi, mostrano mutazioni nelle vicinanze di questo dominio (Jugessur, et al., 2009; Moreno, et al., 2009).

#### ✧ **PVRL1**

Il gene PVRL1 (recettore legato al Poliovirus 1) codifica per la nectina-1, una molecola transmembrana di adesione cellula-cellula, espressa nell'epitelio mediale dei processi palatini, nell'epitelio olfattivo e sulla superficie dell'epidermide (Jugessur, et al., 2009). Una mutazione non senso su questo gene è associata ad una sindrome ad ereditarietà autosomica recessiva, denominata CLPED1 (cleft lip/palate-ectodermal dysplasia syndrome) che, tra le manifestazioni cliniche presenta schisi del labbro e del palato, sindattilia, displasia ectodermica e ritardo mentale. Questa stessa mutazione è stata confermata essere un fattore di rischio nelle schisi non sindromiche (Sozen, et al., 2001; Avila, et al., 2006). Altri studi hanno dimostrato, in diverse popolazioni, l'associazione tra alcuni polimorfismi a carico del gene e la patologia (Scapoli, et al., 2004; Scapoli, et al., 2006; Tongkobetch, et al., 2008).

#### ✧ **SUMO**

La proteina Small Ubiquitine-like Modifier, codificata dal gene SUMO, partecipa alle modificazioni post-traduzionali di molteplici proteine cellulari, intervenendo nel trasporto nucleare, nella regolazione trascrizionale, nell'apoptosi e nel controllo della stabilità proteica. Studi su embrioni di topo al giorno di sviluppo E13.5, che corrisponde nell'uomo al tempo in cui le lamine palatine si avvicinano per fondersi, hanno evidenziato l'espressione di questo gene a livello del labbro superiore, del palato primario ed ai margini dell'epitelio mediale del palato secondario (Alkuraya, et al., 2006).

Studi condotti da Jugessur e colleghi hanno ipotizzato un'interazione sinergica tra SUMO, FGF e fattori di rischio ambientale per le schisi orofacciali. Infatti, molti geni associati a CL/P codificano anche per target di SUMO. Da qui, è facile comprendere come modificazioni aberranti da parte di SUMO sulle proteine di questi geni possano determinare un alto rischio per la patogenesi della schisi (Jugessur, et al., 2009).

### ✧ **TBX22**

È un gene la cui funzione principale sembra essere la repressione trascrizionale (Jugessur, et al., 2009). È stato il primo gene ad essere identificato come locus causale di una sindrome: la palatoschisi associata al cromosoma X. Mutazioni a suo carico sono state anche identificate in pazienti affetti da palatoschisi non sindromica (Marcano, et al., 2004).

### ✧ **TP73L**

Il gene TP73L codifica per la proteina tumorale p63 (Celli, et al., 1999). Diversi autori hanno dimostrato che mutazioni a carico di questo gene determinano l'insorgenza di sindromi che manifestano schisi facciale sia sindromica che non (Ianakiev, et al., 2000; Leoyklang, et al., 2006).

### ✧ **MTHFR**

Il gene MTHFR (Metilen-tetraidrofolato reduttasi) localizzato sul cromosoma 1p36, riveste un ruolo chiave nella via metabolica del folato e nella regolazione dell'omocisteina plasmatica (Leclerc and Rozen, 2007). Alterazioni a diversi livelli della via metabolica del folato e nel metabolismo dell'omocisteina sono state fortemente associate a difetti di chiusura del tubo neurale. Dal momento che la chiusura del tubo neurale e la fusione delle lamine palatine prevedono modalità molecolari ed istologiche sovrapponibili, tale gene viene considerato un'importante fattore di rischio anche per la schisi (Zhao, et al., 2006).

Nell'ambito delle schisi orofacciali sono stati ampiamente studiati due polimorfismi a carico del gene MTHFR: C677T e A1298C e per entrambi è stata dimostrata associazione con la malattia (Molloy, et al., 1997; van der Put, et al., 1998; Weisberg, et al., 1998; Jugessur, et al., 2003b). Nello specifico, madri presentanti la variante 677T, che non hanno ricevuto il folato all'interno di integratori durante il periodo periconcezionale, hanno un rischio aumentato di avere un bambino affetto da schisi, a causa della ridotta attività dell'enzima nella sua forma mutata (Martinelli, et al., 2001; van Rooij, et al., 2003). Tuttavia, altri due studi hanno riportato risultati contrastanti con i precedenti, dimostrando che la supplementazione di folato riduce il rischio di labiopalatoschisi ma che i suoi effetti sono indipendenti dai polimorfismi presenti sul gene (Boyles, et al., 2008; Butali, et al., 2013).

✧ **RAR $\alpha$**

RAR $\alpha$  al locus 17q21.1, codifica per il recettore dell'acido retinoico importante nella palatogenesi (Damm, et al., 1993; Studer, et al., 1994).

Studi condotti da Chenevix-Trench e colleghi (Chenevix-Trench, et al., 1992) hanno confermato che mutazioni a carico dei geni TGF $\alpha$  e RAR $\alpha$  aumentano il rischio di schisi nel 50% dei casi studiati. Altri studi invece, hanno riportato risultati contrastanti, non confermando l'associazione con la malattia nelle popolazioni studiate (Vintiner, et al., 1993; Stein, et al., 1995; Kanno, et al., 2002).

## 2. SCOPO DELLA RICERCA

Le schisi orofacciali costituiscono il più comune difetto malformativo craniofacciale, che determina gravi difficoltà nell'alimentazione, difetti a livello fonetico, con conseguenti problemi sia estetici che psicologici. Per questi motivi, il trattamento di tali disordini richiede un programma assistenziale multidisciplinare protratto fino all'età adulta, che prevede competenze e costi sanitari elevati.

L'eziologia multifattoriale vede l'interazione di fattori sia genetici che ambientali, molti dei quali non ancora identificati. Pertanto, la necessità di accertare i geni realmente coinvolti è molto elevata ed è fondamentale, da un lato per fornire nuovi spunti per la diagnosi e la prevenzione, e dall'altro per comprendere i meccanismi molecolari alla base dello sviluppo embrionale. Gli studi pubblicati indicano un consistente livello di eterogeneità genetica tra le popolazioni, risulta pertanto rilevante un'indagine specifica per la popolazione italiana.

L'obiettivo del mio progetto, svolto durante il triennio di Dottorato, è stato quello di investigare la componente genetica della NSCL/P, selezionando possibili *loci* e geni candidati, e verificando il loro coinvolgimento nell'eziologia della malformazione.

Nell'ultimo decennio, tra le diverse regioni cromosomiche oggetto di studio, la più indagata è stata la regione 6p23 (Eiberg, et al., 1987; Carinci, et al., 1995; Moreno, et al., 2004). In particolare, i ricercatori del mio gruppo hanno evidenziato la presenza di *linkage* per il 60% delle famiglie indagate ed un microsatellite localizzato in questa regione candidata, oltre alla presenza di eterogeneità genetica (Scapoli, et al., 1997).

Più recentemente, nel tentativo di identificare il gene effettivamente responsabile dell'aumento del rischio di sviluppare la schisi, lo stesso gruppo ha condotto esperimenti di espressione genica in embrioni di topo, evidenziando che JARID2 è altamente e specificamente espresso a livello delle cellule epiteliali delle lamine palatine.

Lo studio di *linkage disequilibrium* basato su nuclei familiari ha evidenziato associazione allelica tra polimorfismi di JARID2 e la NSCL/P, supportando ulteriormente un ruolo per questo gene nell'eziologia della malformazione (Scapoli, et al., 2010). Quasi contemporaneamente, gruppi indipendenti hanno riportato che JARID2 fa parte o agisce come partner del complesso PRC2 (Polycomb repressive complex 2) (Peng, et al., 2009; Pasini, et al., 2010), un complesso multiproteico che agisce come master controller della regolazione genica modificando la conformazione della cromatina. L'azione di PRC2 risulta infatti fondamentale nel determinare quegli articolati cambiamenti trascrizionali legati alla differenziazione cellulare e alla morfogenesi. Durante la formazione del labbro e del palato, processi tissutali si avvicinano, convergono e fondono tra loro. Il processo di fusione avviene grazie alla transizione epitelio-mesenchimale (EMT) delle cellule che rivestono i processi in

fusione. È plausibile supporre che l'aumento dell'espressione di JARID2 osservato nelle cellule epiteliali delle lamine palatine che si approssimano alla fusione sia riconducibile al reclutamento di PRC2 necessario per la transizione epitelio-mesenchimale. Le indicazioni che hanno permesso di collegare l'azione di PRC2 allo sviluppo del labbro e del palato aprono il campo a nuove ipotesi di lavoro. Infatti, partendo da questi ultimi nuovi dati, ho identificato polimorfismi di geni che codificano per elementi o partner del complesso PRC2 ed ho verificato la loro associazione con la malattia.

Attenendomi a tale indagine, nel periodo formativo che ho trascorso all'estero, presso il laboratorio della Dott.ssa Elisabeth Mangold (Institute of Human Genetics) dell'Università di Bonn, ho selezionato e genotipizzato alcune varianti alleliche di geni appartenenti a ed interagenti con il complesso Polycomb risultate interessanti dopo un'adeguata meta-analisi. Sempre nel laboratorio della Dott.ssa Mangold ho avuto l'opportunità di analizzare, su un campione di studio rappresentativo della popolazione italiana, l'associazione tra la malattia e 15 regioni cromosomiche, già identificate mediante GWAS (genome-wide association study) su altre coorti di studio (Rahimov, et al., 2008; Birnbaum, et al., 2009; Moreno, et al., 2009; Beaty, et al., 2010; Mangold, et al., 2010; Beaty, et al., 2013; Aldhorae, et al., 2014 ; Ludwig, et al., 2014).

Come ampiamente descritto, la schisi è una patologia multifattoriale dovuta all'interazione tra componenti genetiche e fattori ambientali. Tra questi ultimi risultano di fondamentale importanza sia l'alimentazione che l'apporto vitaminico. Negli ultimi anni, gli studi incentrati sulla catena dell'acido folico hanno permesso di evidenziare il ruolo chiave di questa via metabolica nello sviluppo orofacciale e alterazioni a carico dei geni che codificano per enzimi, recettori o carrier, possono essere considerati possibili fattori di suscettibilità per la NSCL/P.

Anche il mio gruppo di ricerca ha concentrato parte dei suoi studi su questa importante via metabolica, dimostrando il coinvolgimento di diversi suoi geni nell'insorgenza della NSCL/P (Martinelli, et al., 2001; Martinelli, et al., 2006; Martinelli, et al., 2011).

Procedendo in quest'ottica, in questo triennio di Dottorato, ho voluto estendere l'indagine ad altri due geni che, in modo diverso, agiscono nell'ambito della via metabolica del folato: il gene RFC1 ed il gene DHFR.

Il gene RFC1 è un carrier del folato ridotto, essenziale per il mantenimento della concentrazione adeguata di folato intracellulare e già dimostrato essere implicato nell'insorgenza di difetti congeniti come la spina bifida (Shaw, et al., 2002; Pei, et al., 2006). Le implicazioni genetiche in questo difetto di sviluppo embrionale sono state spesso fonte di



ispirazione per studiosi delle schisi orofacciali, in virtù della comune origine embrionale delle due strutture.

Invece, il gene DHFR codifica per un enzima in grado di convertire il diidrofolato in tetraidrofolato, un veicolatore del gruppo metile, necessario per la sintesi *de novo* di purine, acido timidilico ed alcuni aminoacidi. E' stato riportato che madri esposte all'azione di inibitori del diidrofolato riduttasi (es.: carbamazepina, fenitoina, fenobarbital, primidone) nel primo trimestre di gravidanza raddoppiano il rischio di generare prole affetta da NSCL/P (Hernandez-Diaz, et al., 2000). Ad oggi, in letteratura, non ci sono studi che valutino il ruolo del DHFR nelle malformazione; abbiamo quindi voluto verificare se polimorfismi del gene DHFR possano influenzare il rischio di NSCL/P.

Ho quindi ritenuto i due geni buoni candidati nell'ambito delle cause che stanno alla base dell'insorgenza della NSCL/P.

### 3. MATERIALI

E

METODI

### 3.1 Popolazione di studio

Nel corso dei tre anni di Dottorato, ho valutato l'eventuale associazione tra polimorfismi a singolo nucleotide di geni mappanti in diverse regioni cromosomiche e l'insorgenza della NSCL/P.

Per ogni indagine genetica condotta mi sono avvalsa di un campione di studio che nel tempo si è modificato in base alla disponibilità dei diversi campioni, ma sempre composto da padre, madre e probando affetto da schisi del labbro con o senza schisi del palato (triade). In particolare, nell'indagine condotta nell'ambito della via metabolica dell'acido folico, ho impiegato 404 triadi per lo studio del gene RFC1 e 400 triadi per indagare il gene DHFR. In 147 delle 404 triadi analizzate per il gene RFC1, i probandi non presentano familiarità e vengono quindi considerati casi sporadici, mentre i restanti 257 presentano, all'interno della famiglia, parenti affetti da schisi, e vengono quindi considerati casi familiari. Invece, delle 400 triadi indagate per il gene DHFR, 286 sono rappresentative di casi sporadici e 114 sono da considerarsi familiari.

Per l'indagine condotta sui geni appartenenti a ed interagenti con il complesso Polycomb ho esaminato 109 triadi in cui è presente almeno un altro parente affetto oltre al probando e 284 triadi per le quali il probando rappresenta l'unico caso di schisi nell'intera famiglia.

In ultimo, durante il mio periodo formativo all'estero, in un campione di studio rappresentativo della popolazione italiana composto da 389 famiglie (365 triadi e 24 diadi), di cui 283 considerati casi sporadici e 106 familiari, ho analizzato l'associazione tra la malattia e 15 regioni cromosomiche, già identificate dallo stesso gruppo di ricerca della Dott.ssa Mangold mediante GWAS condotto su altre coorti di studio. Sempre sullo stesso campione di studio, ho anche genotipizzato alcune varianti alleliche di geni appartenenti al complesso Polycomb risultate interessanti dopo un'adeguata meta-analisi.

Il reclutamento, dei campioni di sangue periferico, dei probandi affetti da NSCL/P e dei loro genitori, prelevati previo consenso informato nell'ambito di un progetto approvato dai relativi Comitati Etici, provengono dai reparti di Chirurgia Maxillo-Facciale di diversi Ospedali Italiani che hanno collaborato alla raccolta. Lo studio è stato condotto in conformità con le linee guida enunciate nella Dichiarazione di Helsinki.

L'osservazione clinica/strumentale ci ha permesso di classificare tutti i probandi come *non sindromici*. Su tutti i campioni è stata eseguita un'attenta anamnesi familiare, al fine di escludere altre patologie somatiche o neurologiche e per documentare l'assunzione di farmaci, fumo e/o complessi multivitaminici nel periodo periconcezionale o durante la gravidanza stessa.

### 3.2 Estrazione del DNA genomico

A ciascun probando ed ai suoi genitori sono stati prelevati circa 10ml di sangue venoso periferico, poi conservati a -20°C in presenza di EDTA come anticoagulante. L'estrazione del DNA genomico è stata effettuata secondo il protocollo allegato al kit GenElute™ Blood Genomic DNA della Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

Il protocollo prevede le seguenti tappe:

- 1) 200µl di sangue vengono aliquotati in un tubo da centrifuga da 1,5ml.
- 2) Si aggiungono 20µl di proteinasi K, che digerisce le proteine e neutralizza le nucleasi, con lo scopo di facilitare la lisi cellulare.
- 3) Si aggiungono al campione 200µl del tampone di lisi fornito dal kit che ha la funzione di frammentare le membrane plasmatiche e nucleari, che vanno quindi in soluzione. La lisi è favorita da un'agitazione al vortex e da una successiva incubazione a 55°C per 10 min.
- 4) Per massimizzare il legame del DNA alla resina della colonnina fornita col kit e ottenere così rendimenti più consistenti, si aggiungono 500µl di Column Preparation Solution alla GenElute Miniprep Binding Column, che viene poi posta in centrifuga a 12.000g per 1 min. Si elimina l'eluato.
- 5) Si aggiungono 200µl di etanolo (95-100%) al lisato del punto 3); si vortexa quindi per 1 min. per ottenere una soluzione omogenea.
- 6) Si trasferisce la mix così ottenuta nella colonna precedentemente trattata al punto 4) e si centrifuga a 6.500g per 1 min.
- 7) Si elimina l'eluato contenente i residui cellulari precedentemente lisati e si trasferisce la colonna in un nuovo tubo di scarico.
- 8) Si aggiungono 500µl di Prewash Solution nella colonna, si centrifuga a 6.500g per 1 min. e si elimina l'eluato. Questo trattamento viene eseguito su sangue più vecchio di 24 ore, per eliminare i contaminanti associati. Nell'eventualità in cui il sangue sia fresco, si passa direttamente al punto 9).
- 9) Si aggiungono 500µl di Wash Solution e si centrifuga alla massima velocità per 3 min. per asciugare la colonna. L'etanolo deve essere infatti completamente eliminato prima dell'eluizione finale del DNA in soluzione.
- 10) Si elimina l'eluato e si inserisce la colonna in un nuovo tubo da centrifuga da 2ml per la raccolta del DNA.
- 11) Si fanno gocciolare 200µl di Elution Solution direttamente sulla resina della colonna. Si centrifugare per 1 min. a 6.500g per eluire il DNA. Per incrementare

l'efficienza di eluizione si può incubare 5 min. a temperatura ambiente dopo aver aggiunto la soluzione che stacca il DNA dalla resina e ne consente la raccolta.

12) Si trasferisce infine l'eluato in provette pulite per lo stoccaggio.

### 3.3 Quantificazione del DNA

Il Thermo Scientific Nanodrop è un sistema che permette di quantificare la presenza di acidi nucleici ed eventuali proteine nel campione in esame, testandone una quantità decisamente ridotta (0,5 – 2µl) rispetto agli spettrofotometri standard. Il sistema di ritenzione dei campioni sfrutta la tensione superficiale del liquido per trattenere in sede, tra due fibre ottiche, un campione con volume molto piccolo, altamente concentrato, senza la necessità di diluizioni. Il campione viene posto tra le due fibre ottiche (fibra sorgente e fibra di ricezione), mentre una lampada luminosa allo xeno fornisce la sorgente di luce che verrà analizzata dallo spettrofotometro dopo aver attraversato il campione.

Il Nanodrop viene precedentemente tarato impiegando un campione neutro (bianco) che sarà poi utilizzato dal sistema per calcolare, una volta saggiato il campione, l'assorbanza secondo questa equazione:

$$\text{Assorbanza} = -\log \left[ \frac{\text{intensità (campione)}}{\text{intensità (bianco)}} \right]$$

L'equazione di Lambert-Beer è usata per correlare l'assorbanza alla concentrazione:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

A = assorbanza

$\varepsilon$  = coefficiente di assorbanza

b = cammino ottico in cm

c = concentrazione dell'analita in molarità (M)

Il saggio per gli acidi nucleici permette di misurare concentrazione e qualità di un estratto con l'utilizzo dell'equazione di Lambert-Beer. L'equazione viene modificata per l'utilizzo dei fattori con unità ng-cm/µl.

$$C = (A \cdot \varepsilon) / b$$

C = concentrazione di acido nucleico in ng/µl

A = assorbanza in AU

$\varepsilon$  = lunghezza d'onda dipendente dal coefficiente di estinzione in ng-cm/µl

b = cammino ottico in cm

I coefficienti di estinzione generalmente accettati per gli acidi nucleici sono:

- ✓ DNA a doppia elica: 50ng-cm/μl
- ✓ DNA a singolo filamento: 33ng-cm/μl
- ✓ RNA: 40ng-cm/μl.

### 3.4 Selezione dei polimorfismi

I polimorfismi a singolo nucleotide (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) sono marcatori bi-allelici (presentano cioè solo due varianti alleliche) che prevedono la sostituzione di una base azotata con un'altra (transizioni, transversioni), ma anche le delezioni e le inserzioni di basi singole sono considerate variazioni comuni.

Rappresentano la variazione genica più comune nell'uomo, pertanto sono diventati i marcatori più frequentemente utilizzati nelle mappe degli studi di associazione. Rappresentano il 90% di tutti i polimorfismi presenti nel genoma umano (Schafer and Hawkins, 1998); sono presenti nella popolazione con una frequenza allelica  $\geq 1\%$  e con una densità di 1 ogni circa 300 basi.

Gli SNPs possono presentarsi all'interno di una regione intronica, in una regione intergenica e in una sequenza codificante di un gene. In quest'ultimo caso, lo SNP può modificare la sequenza amminoacidica codificata dando origine ad una mutazione non-sinonima oppure può cambiare solo il codone ma non l'amminoacido originando una mutazione sinonima.

Gli SNPs possono anche trovarsi in sequenze non codificanti che tuttavia possono essere in grado di alterare la funzionalità del gene, agendo sulla trascrizione o traduzione, sullo splicing o sulla stabilità dell'RNA.

Nel selezionare i polimorfismi da utilizzare nello studio di associazione allelica sfruttando le mappe di *linkage disequilibrium* elaborate dal consorzio internazionale per il progetto HapMap ([www.hapmap.com](http://www.hapmap.com)), ho utilizzato il software Haploview (Barrett, et al., 2005) ed il software Life Technologies SNPbrowser (Life Technologies, Foster City, CA). Entrambi i programmi, imponendo loro la regione cromosomica d'interesse, consentono di selezionare il set di polimorfismi più informativi (tagSNPs), in grado di catturare la diversità genetica della regione in esame.

Le informazioni relative ad ogni SNP sono raccolte in opportune banche dati, sempre aggiornate, che permettono di selezionare i marcatori adatti ad ogni scopo.

L'analisi dei polimorfismi selezionati per questo studio sarà approfondita nei prossimi capitoli.

### 3.5 GENOTIPIZZAZIONE

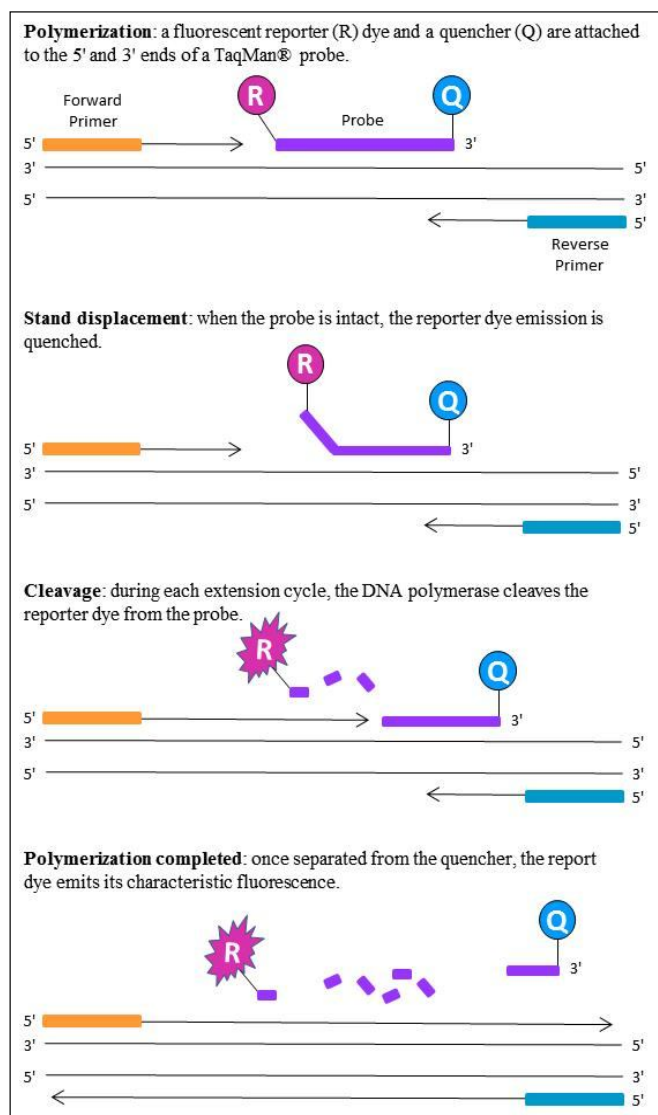
#### 3.5.1 Real-Time PCR (TaqMan)

La Real-Time PCR (RT-PCR) è un metodo automatizzato di amplificazione e quantificazione degli acidi nucleici che permette la visualizzazione e la misurazione del prodotto generato durante la fase esponenziale del processo di PCR. Tale metodica è possibile grazie alla presenza di coloranti fluorescenti, che intercalano il DNA a doppio filamento, o di sonde oligonucleotidiche, disegnate per ibridarsi alla sequenza target di interesse, coniugate con opportuni fluorocromi.

La genotipizzazione degli SNPs sui campioni d'interesse è stata effettuata mediante la Real-Time PCR utilizzando il metodo delle sonde TaqMan<sup>®</sup> (Figura 3), una tecnica di rilevazione che consente di determinare il genotipo in base all'emissione di fluorescenza da parte di fluorofori legati a sonde allele-specifiche.

Nello specifico, questa metodica prevede l'impiego di una coppia di primer fiancheggianti il polimorfismo d'interesse e di una coppia di sonde TaqMan<sup>®</sup> (oligonucleotidi di circa 20-30bp) specifiche per ciascun allele dello SNP. Le due sonde sono coniugate in 5' con due differenti fluorocromi (generalmente VIC e FAM) con funzione di Reporter (R). In 3' le sonde sono coniugate con una molecola con funzione di Quencher (Q) (solitamente BHQ1), in grado di assorbire la fluorescenza emessa da R grazie al fenomeno di trasferimento di energia di risonanza (FRET).

Nel corso della reazione di PCR la sonda si appaia per complementarietà e viene degradata dall'attività esonucleasica della DNA polimerasi durante l'estensione (Holland, et al., 1991). Il taglio consente l'allontanamento di Q da R con conseguente emissione di fluorescenza. L'intensità della fluorescenza, rilevata dal detector, aumenta in maniera proporzionale alla degradazione della sonda che avviene ad ogni ciclo di PCR, permettendo di discriminare le varianti alleliche. In presenza di segnale da parte di un unico fluorocromo, il campione avrà genotipo omozigote, mentre in presenza di segnale da entrambi i fluorocromi, si tratterà di un campione eterozigote.



**Figura 3.** Schema riassuntivo del funzionamento delle sonde TaqMan®.

Le amplificazioni sono state realizzate utilizzando due diversi strumenti:

- Sequence Detection System ABI PRISM® 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.).
- LightCycler® (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Per entrambi è stato seguito il protocollo fornito dalla ditta Applied Biosystems (ora Life Technologies, Monza, Italia).

Le reazioni di PCR eseguite sia con il Sequence Detection System ABI PRISM® 7500 che con il LightCycler® prevedono l'impiego di 5µl di 2X TaqMan® Universal PCR Master Mix (Life Technologies, Monza, Italia) contenente la DNA polimerasi, che per il LightCycler® è una HotStarTaq DNA polimerasi, il Buffer ed i dNTPs; alla Mix vengono aggiunti 0,25µl di 40X SNP Genotyping Assay Mix contenente i primers di amplificazione



e le sonde TaqMan allele-specifiche per ciascun polimorfismo e 1µl (10ng/µl) di DNA genomico e H<sub>2</sub>O ultrapura per ottenere un volume totale di 10µl.

L'amplificazione con il termociclatore ABI PRISM<sup>®</sup> 7500 prevede 2 min. a 50°C per l'attivazione della Taq DNA polimerasi; 10 min. a 95°C per la denaturazione del DNA e 40 cicli suddivisi in due fasi: 15 sec. a 95°C per la denaturazione e 1 min. a 60°C per l'appaiamento e l'amplificazione.

Invece, l'amplificazione eseguita mediante il LightCycler<sup>®</sup> prevede l'attivazione della HotStarTaq DNA polimerasi (10 min. a 95°C) a cui seguono 45 cicli suddivisi in quattro fasi: 10 sec. a 95°C per la denaturazione, 30 sec. a 60°C per l'appaiamento, 30 sec. a 72°C per l'elongazione e 3 sec. a 75°C.

### 3.5.2 Piattaforma Sequenom<sup>®</sup>

Per lo screening e l'analisi dei polimorfismi abbiamo anche utilizzato la piattaforma Sequenom MassARRAY<sup>®</sup> (Sequenom, Inc. San Diego, CA), utilizzando il protocollo Iplex<sup>™</sup>Gold (Tang, et al., 1995; Haff and Smirnov, 1997).

Tale metodica utilizza la tecnologia “multiplexed assays”, che consente di analizzare sino a 30 polimorfismi per ogni campione in contemporanea e raccoglie rapidamente in maniera automatizzata i dati di un massimo di 384 campioni di DNA.

Prima di procedere alla genotipizzazione dei campioni sono stati disegnati gli oligonucleotidi specifici, utilizzando il software Assay Design<sup>®</sup> che valuta sia la formazione di dimeri che l'idoneità dei primers all'esecuzione di una PCR in multiplex.

Il software per ciascun polimorfismo progetta tre oligonucleotidi:

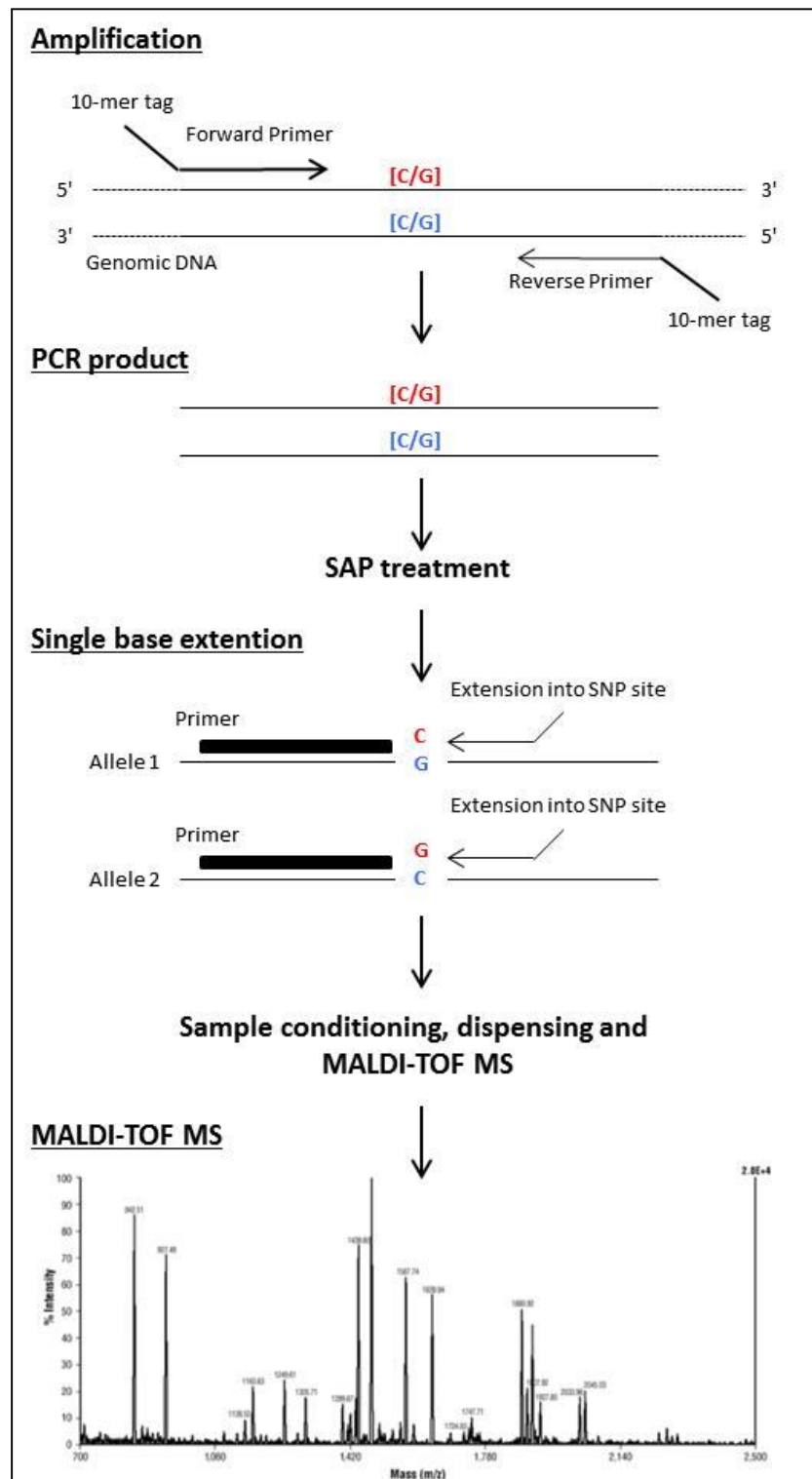
- due che fungono da primer per la multiplex-PCR caratterizzati, all'estremità 5', da una sequenza Tag costituita da 10 nucleotidi (5'-ACGTTGGATG-3') che migliora la resa di ogni reazione di PCR;
- uno per la reazione di estensione di una singola base dell'oligonucleotide che caratterizza il polimorfismo (Single Base Extension).

Per procedere alla genotipizzazione con la piattaforma Sequenom<sup>®</sup>, i campioni di DNA sono stati disposti in piastre da 96 pozzetti. In ciascuna piastra erano presenti 93 diversi campioni di DNA, uno dei quali in duplicato per assicurare il controllo di qualità, oltre ad un campione di controllo positivo ed uno negativo.

Quattro piastre da 96 pozzetti sono state combinate in una piastra da 384. Utilizzando un pipetting robot sono stati trasferiti 2µl di DNA (10ng/µl) dalle piastre da 96 pozzetti in quella da 384, così che in ogni piastra da 384 fossero presenti quattro campioni in doppio,

quattro controlli positivi e quattro controlli negativi. Successivamente, il DNA è stato lasciato asciugare a temperatura ambiente per una notte.

Le diverse fasi per la genotipizzazione dei campioni in esame, sono mostrati in Figura 4 e verranno discussi di seguito.



**Figura 4.** Fasi della genotipizzazione mediante iPLEX Gold MassArray Sequenom®.

**Multiplex-PCR.** Il primo step di reazione è una normale reazione di PCR che ha lo scopo di amplificare tratti di genoma in cui si trovano gli SNPs d'interesse.

Al posto di una singola coppia di primers, è utilizzata una primer mix, che contiene fino a 30 coppie di primers in grado di amplificare simultaneamente tutte le regioni target specifiche.

La reazione è stata allestita secondo il seguente protocollo (Tabella 2):

Reagenti	Volume $\mu\text{l}$ (1rxn)	Concentrazione finale
PCR buffer 10X incl. 15mM $\text{MgCl}_2$	0,625	1.25X, 1.88mM $\text{MgCl}_2$
$\text{MgCl}_2$ (25mM)	0,325	1.625mM
dNTPs (10mM ognuno)	0,25	0.5mM ognuno
Primers mix (500nM ognuno)	1	100nM ognuno
HotStarTaq (5U/ $\mu\text{l}$ )	0,2	1U/rxn
$\text{H}_2\text{O}$ ultrapura	2,6	
Volume finale	5	

**Tabella 2.** Protocollo per multiplex PCR.

In ciascun pozzetto della piastra da 384, contenente il DNA essiccato, sono stati trasferiti con il pipetting robot, 5 $\mu\text{l}$  della PCR mix.

La reazione di amplificazione è stata eseguita in un termociclatore impostando i seguenti parametri di amplificazione (Tabella 3):

Step	Temperatura	Time	Numero di cicli
Denaturazione iniziale	95°C	15min	1
Denaturazione	95°C	20sec	45
Appaiamento	56°C	30sec	
Estensione	72°C	1min	
Estensione finale	72°C	3min	1

**Tabella 3.** Programma Thermocycling per multiplex PCR.

**Defosforilazione SAP.** I prodotti di reazione sono stati trattati enzimaticamente mediante una Fosfatasi Alcalina o SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) per neutralizzare i dNTPs non incorporati nella reazione di PCR multiplex. La SAP allontana un gruppo fosfato dai

dNTPs non incorporati convertendoli in 2'-deoxynucleoside-5'-diphosphate (dNDP) rendendoli così indisponibili per le reazioni successive.

La reazione avviene aggiungendo al prodotto di PCR 2 $\mu$ l di SAP mix con il pipetting robot, secondo il seguente protocollo (Tabella 4):

Reagenti	Volume $\mu$ l (1rxn)	Concentrazione finale
SAP buffer 10X	0,17	0.85X
SAP enzima (1U/ $\mu$ l)	0,3	0.3U/rxn
H <sub>2</sub> O ultrapura	1,53	
Volume finale	2	

**Tabella 4.** Protocollo per defosforilazione SAP.

Impostando i seguenti parametri nel termociclatore (Tabella 5):

Temperatura	Time
37°C	40 min.
85°C	5 min.
4°C	$\infty$

**Tabella 5.** Programma Thermocycling per defosforilazione SAP.

**Single-base extension (SBE).** Per la genotipizzazione sono stati utilizzati i primers di estensione disegnati in modo che il 3' di ciascun primer si trovi immediatamente prima rispetto al sito polimorfico d'interesse; inoltre, sono stati utilizzati dei nucleotidi con massa modificata, 2', 3'-dideoxynucleoside-5'-triphosphate (ddNTPs = ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) ciascuno caratterizzato da un peso molecolare modificato (Mass-Modified Terminator) (Tabella 6) che permette la discriminazione univoca dei diversi prodotti di estensione.

Terminatori	A	C	G	T
A	0	-24	16	55,9
C	24	0	40	79,9
G	-16	-40	0	39,9
T	-55,9	-79,9	-39,9	0

**Tabella 6.** Differenti masse in Dalton dei prodotti iPLEX in funzione dei due alleli coinvolti nello SNP.

I primers di estensione sono stati divisi in quattro classi in base alle loro masse, ed utilizzati a diverse concentrazioni per equilibrare il rapporto segnale/rumore nello spettro di massa finale. In questo caso, le concentrazioni utilizzate erano: 7 $\mu$ M, 9,3 $\mu$ M, 11,6 $\mu$ M, 14 $\mu$ M.

Una DNA polimerasi catalizza l'aggiunta enzimatica nel sito polimorfico di uno fra i quattro ddNTPs. Questi, una volta incorporati, interrompono l'addizione di nuovi nucleotidi ai prodotti di estensione dei primers e aumentano la massa del prodotto di PCR. I prodotti di estensione allele-specifici così generati, sono distinti l'uno dall'altro dalla diversa massa molecolare, che è in grado di essere rilevata dallo spettrofotometro di massa. Il protocollo per la reazione è il seguente (Tabella 7):

Reagenti	Volume $\mu$ l (1rxn)	Concentrazione finale
Buffer iPLEX Gold 10X	0,2	1X
Mix di terminazione	0,2	
Mix estensione primers	0,94	7 $\mu$ M, 9,3 $\mu$ M, 11,6 $\mu$ M, 14 $\mu$ M
Enzima iPLEX	0,041	1X
H <sub>2</sub> O ultrapura	0,619	
Volume finale	2	

**Tabella 7.** Protocollo per single-base extension.

2 $\mu$ l del tampone di reazione sono stati aliquotati in ogni pozzetto della piastra da 384 e sono stati impostati i seguenti parametri nel termociclatore (Tabella 8):

Step	Temperatura	Time	Numero di cicli	
Denaturazione iniziale	94°C	30sec		
Denaturazione	94°C	5sec	20	45
Appaiamento	52°C	5sec		
Estensione	80°C	5sec		
Estensione finale	72°C	3min		

**Tabella 8.** Programma Thermocycling per SBE.

Al termine di quest'ultima reazione di PCR i prodotti sono stati sottoposti a purificazione con CleanResin<sup>®</sup> (Sequenom<sup>®</sup>) per l'eliminazione di sali o altri contaminanti che potrebbero interferire con l'analisi allo Spettrofotometro di Massa. Ogni campione è stato diluito in 16µl di H<sub>2</sub>O nanopura, addizionato con 6mg di Sequenom Clean Resin<sup>®</sup> e centrifugato a 4.000rpm, a 25°C per 7 min., per favorire il deposito della resina sul fondo dei pozzetti.

Una microaliquota (25nl) di ogni prodotto di reazione iPLEX e di una soluzione, contenente tre oligonucleotidi di dimensioni stabilite per calibrare il sistema di analisi, sono stati distribuiti su un 384-spot SpectroChip (Sequenom<sup>®</sup>) utilizzando il MassARRAY<sup>®</sup> nano dispenser.

Lo SpectroChip è costituito da un chip in silicone diossido, fotoresistente, in formato da 384 pozzetti "pre-spottati" con una particolare matrice MALDI.

L'analisi dello SpectroChip avviene con lo spettrometro di massa denominato MassARRAY<sup>®</sup> Compact Analyzer che, mediante opportuni campi magnetici, permette di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica ( $m/z$ ). Lo SpectroChip viene irradiato da un fascio laser che ionizza le molecole dei campioni. Queste diventano instabili e si frammentano in ioni più leggeri in funzione della loro struttura chimica. Il flusso di ioni prodotto entra nell'analizzatore TOF, una colonna ad alto vuoto, che misura il "tempo di volo" (TOF) impiegato da ciascuno ione per percorrere l'intero spazio dell'analizzatore e giungere al rivelatore.

Il TOF è proporzionale alla massa e quindi alla composizione nucleotidica del frammento di DNA. Per ogni SNP, ciascun allele può essere differenziato in base alla velocità relativa o TOF relativo.

Alla fine dell'esame, un software dedicato converte per ciascun campione i valori misurati (TOF e massa) in genotipo, rilevando così la presenza del polimorfismo in condizioni di omo- o di eterozigosi.

### 3.6 ANALISI STATISTICA

Al fine di verificare l'associazione tra i vari polimorfismi analizzati ed il fenotipo schisato, i dati raccolti sono stati sottoposti ad analisi statistica.

I genotipi raccolti sono stati testati per la verifica dell'equilibrio di Hardy Weinberg, quindi sottoposti all'analisi del *linkage disequilibrium* e all'analisi degli aplotipi utilizzando diversi software a nostra disposizione, come il software UNPHASED versione 3.1.7 (Dudbridge, 2008), il programma FAMHAP (Becker and Knapp, 2004) ed il software FBAT v1.7.3 (Horvath, et al., 2001).

#### 3.6.1 Equilibrio di Hardy-Weinberg

L'equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE) è il principio più importante della genetica di popolazione, il cui postulato afferma che le frequenze alleliche e quelle genotipiche non subiscono variazione da una generazione a quella successiva.

Affinché una popolazione si trovi all'equilibrio di Hardy-Weinberg devono essere soddisfatte le seguenti condizioni:

- ❖ gli accoppiamenti devono essere casuali;
- ❖ la popolazione deve essere di grandi dimensioni, teoricamente infinita;
- ❖ non devono verificarsi fenomeni di migrazione, mutazione e selezione naturale;
- ❖ la popolazione deve essere costituita da individui appartenenti a una specie diploide, a riproduzione sessuale e le generazioni non si devono sovrapporre.

Se si verificano tutte queste condizioni, in una popolazione all'equilibrio, le frequenze alleliche e le frequenze genotipiche non variano di generazione in generazione e sono tra loro vincolate dalla seguente relazione.

Tale equilibrio per un locus bi-allelico (A, a) è espresso dalla seguente equazione:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Dove  $p$  e  $q$  indicano le frequenze degli alleli A ed a,  $p^2$  indica la frequenza nella popolazione del genotipo AA, mentre  $q^2$  la frequenza del genotipo aa e  $2pq$  è la frequenza degli eterozigoti Aa.

Il principio di HWE può essere anche applicato a *loci* con tre o più alleli; in questo caso varrà espresso dal quadrato di un polinomio, con tanti termini quanti sono gli alleli al locus considerato.

Per determinare se una popolazione è in equilibrio di Hardy-Weinberg si applica il test statistico del  $\chi^2$  (chi-quadrato) espresso dalla seguente formula:

$$\chi^2_{[g, l]} = \sum (O_i - A_i)^2 / A_i$$

dove  $O_i$  rappresenta la frequenza osservata nella classe  $i$ -esima e  $A_i$  è la frequenza attesa nella classe  $i$ -esima in base all'ipotesi formulata. I gradi di libertà (g. l.) si calcolano sottraendo un'unità al numero di classi in cui è diviso il campione; sottraendo un ulteriore grado di libertà per ognuno dei parametri stimati per il calcolo del  $\chi^2$ .

Tale test permette di confrontare il numero di genotipi osservati con quello degli attesi e stimare se la popolazione sia in equilibrio di Hardy-Weinberg.

### 3.6.2 Transmission Disequilibrium Test (TDT)

Il TDT, sviluppato da Spielman nel 1993 (Spielman, et al., 1993), è sia un test di *linkage* che di associazione allelica, particolarmente adatto a valutare il coinvolgimento di geni candidati nell'eziologia delle malattie mediante l'analisi di polimorfismi interni.

Il metodo è stato ideato per evitare le possibili complicità che incorrono negli studi di associazione allelica basati sul confronto di casi e controlli non correlati, il più comune dei quali è la tendenza a generare “falsi positivi” dovuti a gruppi di controllo inadeguati. Il TDT è studiato per analizzare campioni costituiti da triadi familiari comprendenti figlio affetto e genitori. In pratica, il test valuta se la trasmissione degli alleli del polimorfismo in esame, dai genitori eterozigoti ai figli affetti, sia casuale. L'ipotesi alternativa è invece che ci sia una trasmissione sbilanciata verso l'uno o l'altro allele in relazione allo status del probando.

L'ipotesi nulla del TDT è che gli alleli del marcatore e la malattia segregino in maniera indipendente, in altre parole che i due *loci* non siano in *linkage* genetico, ovvero adiacenti in un cromosoma.

Nel test vengono conteggiate le triadi informative nelle quali si verifica la trasmissione (T) al figlio affetto di un dato allele, ad esempio l'allele B, e le triadi nelle quali l'allele B non viene trasmesso (NT) e quindi viene trasmesso l'altro allele, l'allele C.

Assumendo una trasmissione mendeliana del gene, secondo l'ipotesi nulla per la quale non sussiste *linkage* tra l'allele marcatore ed il gene causativo della malattia, o che non vi sia associazione tra l'allele marcatore e l'allele malattia, T si distribuisce binomialmente rispetto a T+NT.

La significatività statistica viene calcolata con il  $\chi^2$ , anche conosciuto come test di McNemar, con 1 grado di libertà, secondo la formula:

$$\chi^2 = (B - C)^2 / (B + C)$$



La significatività statistica dello scostamento rispetto all'ipotesi nulla è valutata dal *P value* corrispondente, utilizzando generalmente il valore soglia di 0,05, eventualmente corretto nel caso di test multipli. Valori di *P* inferiori a questa soglia indicano che l'allele malattia è vicino al marcatore considerato e quindi, il marcatore è collegato al locus malattia.

Se non si ha *linkage*, gli alleli del marcatore segregano indipendentemente dalla malattia, per cui, la presenza di associazione non causerà differenza tra gli alleli B e C. Analogamente, se si ha *linkage* ma non associazione non c'è nessuna tendenza dell'allele B a differire da C. Quindi il TDT può rilevare la presenza di *linkage* solo se vi è concomitante associazione (*linkage disequilibrium*).

### 3.6.3 Rapporto crociato di rischio: Odd Ratio (OR)

Negli studi per determinare l'associazione tra un polimorfismo ed una patologia si utilizzano metodi di indagine statistica volti a determinare se:

- a) vi sia associazione tra un determinato allele o genotipo e la patologia in esame;
- b) non vi sia associazione tra le due variabili.

Uno dei metodi statistici per verificare queste ipotesi è l'Odd Ratio o rapporto crociato.

Il termine 'Odd' assume il significato di "probabilità a favore" e quindi corrisponde al numero di volte in cui l'evento si verifica (*p*) e il numero di volte in cui non si verifica (*1-p*).

Valutando i dati *R* ottenuti si accetta sempre l'ipotesi più verosimile considerando che per verosimiglianza di un'ipotesi *H* si intende la probabilità *P* di ottenere i dati *R* se è vera l'ipotesi *H*, quindi:  $P(R/H)$ .

Il test Odd Ratio è quindi applicato per definire *P* e viene espresso come:

$$\text{Odds Ratio} = H_i / H_{\text{non-}i}$$

Dove:  $H_i$  = verosimiglianza dell'ipotesi

$H_{\text{non-}i}$  = possibilità che l'ipotesi sia sbagliata

Si utilizza quindi la formula:

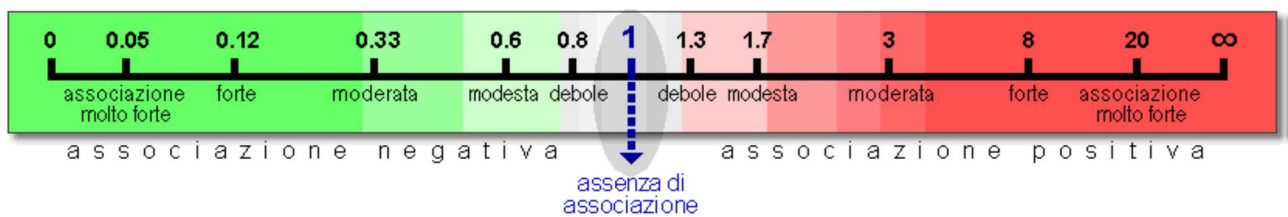
$$\text{Odds ratio} = \frac{a/b}{c/d} = \frac{a}{b} * \frac{d}{c} = \frac{ad}{bc}$$

→

	sì malattia	no malattia
sì esposizione	a	b
no esposizione	c	d

L'OR può assumere valori da zero a infinito (Figura 5).

Se il valore del test è 1 (OR = 1) si ha associazione negativa perché troviamo la stessa proporzione dell'allele tra gli individui sani e quelli malati; quindi il polimorfismo è indipendente dalla malattia. Per valori < 1 (OR < 1) l'associazione è negativa, quindi l'allele è "protettivo" nei confronti della patologia. Valori > 1 (OR > 1) indicano un'associazione tra l'allele e la malattia, pertanto la presenza dell'allele aumenta il rischio di sviluppare malattia. L'associazione è tanto più elevata quanto più elevato è il valore di OR.



**Figura 5.** Schema di interpretazione dei valori assunti dall'Odd Ratio.

Per verificare se i risultati dell'OR siano significativi si può calcolare l'intervallo di confidenza (CI) al 95%. Infatti se all'interno di questo intervallo è presente il valore 1, il risultato dell'OR non è significativo perché anche l'OR potrebbe assumere il valore 1 che indica l'assenza di associazione.

Si calcola applicando la seguente formula:

$$\text{Ln (OR)} \pm 1,96 \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}}$$

dove 1,96 è un valore costante e il segno  $\pm$  permette il calcolo del limite superiore e del limite inferiore dell'intervallo al 95% del logaritmo naturale dell'OR. A questo punto è sufficiente verificare la presenza del valore 1 all'interno dell'intervallo: se l'1 è presente, il valore di OR non è significativo, in caso contrario, è significativo.

# *4. RISULTATI*

# *E*

# *DISCUSSIONE*

#### 4.1 STUDIO DI GENI COINVOLTI NELLA VIA METABOLICA DELL'ACIDO FOLICO

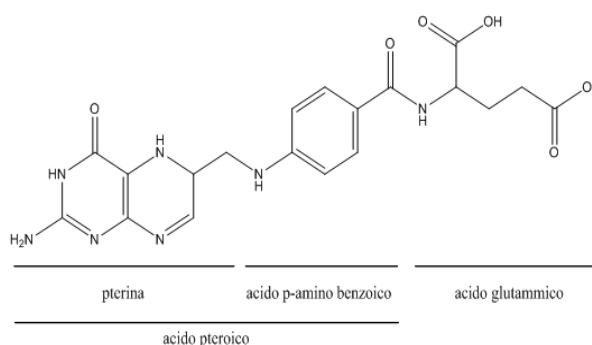
La NSCL/P è una patologia complessa, determinata dall'interazione di diversi geni con un'importante componente ambientale. In letteratura sono stati ampiamente documentati gli studi effettuati allo scopo di evidenziare i geni e le regioni cromosomiche coinvolti nell'insorgenza di questa patologia (Dixon, et al., 2011), ma importante risulta anche il contributo eziologico di numerosi fattori ambientali come l'alimentazione e l'apporto vitaminico.

Evidenze raccolte negli ultimi vent'anni inducono ad ipotizzare che la biodisponibilità di micronutrienti, soprattutto di folati, svolga un ruolo chiave nella patogenesi della NSCL/P (Wehby and Murray, 2010).

L'acido folico o acido pteroil-glutammico o vitamina B9 è stato scoperto negli anni '30 da Lucy Willis studiando l'anemia macrocitica nella donna in gravidanza (Willis and Mehta, 1930).

L'acido folico è una molecola coniugata costituita da tre porzioni distinte (Figura 6):

- l'anello doppio di una pteridina eterociclica, la 6-metilpterina;
- l'acido p-aminobenzoico (PABA);
- l'acido glutammico.



**Figura 6.** Struttura dell'acido folico.

Contrariamente ai batteri ed alle piante, le cellule animali non sono in grado di sintetizzare l'acido folico che deve quindi essere introdotto con la dieta. Le fonti principali sono rappresentate dalle verdure a foglia verde come i broccoli, gli spinaci, gli asparagi, la lattuga; la frutta come fragole, arance, limoni, kiwi, banane, nocciole; i cereali, il lievito di birra, i funghi ed il cioccolato.

La dose giornaliera raccomandata per gli adulti è di 400µg; per le donne in gravidanza e in allattamento 500µg - 600µg (Gropper, et al., 2009).

L'acido folico è fondamentale per un corretto sviluppo embrionale, in quanto interviene in numerose reazioni metaboliche che vanno dalla rimetilazione dell'omocisteina a metionina, alla sintesi dei nucleotidi, dalla sintesi dell'emoglobina alla metilazione di DNA, proteine, neurotrasmettitori e fosfolipidi (Crider, et al., 2012).

Studi osservazionali documentano che l'assunzione supplementare di acido folico, da solo o in associazione ad altre vitamine del gruppo B (B6, B12), nei primi mesi di gravidanza, riduce il rischio d'insorgenza di difetti di chiusura del tubo neurale (NTD), associati a spina bifida e anencefalia (Beaudin and Stover, 2009), oltre al rischio di insorgenza della NSCL/P (Czeizel, 1993).

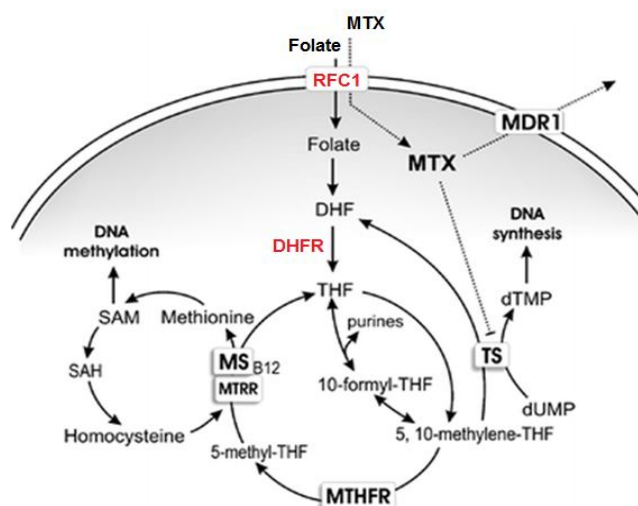
Numerosi studi sono stati dedicati a chiarire il ruolo dell'acido folico nella patogenesi della NSCL/P, ma spesso con risultati contraddittori, riconducibili, probabilmente, alle differenze etniche ed ambientali che caratterizzano le diverse popolazioni da cui provengono le casistiche analizzate. Diversi studi di meta-analisi hanno tuttavia evidenziato l'effetto protettivo dell'acido folico rispetto al rischio di NSCL/P (Badovinac, et al., 2007; Johnson and Little, 2008).

Molti studi ecogenetici hanno valutato l'interazione tra varianti genetiche e la somministrazione di acido folico durante il primo trimestre di gravidanza. Le ricerche si sono concentrate prevalentemente sull'analisi di polimorfismi in geni del metabolismo e del trasporto dei folati.

Anche il mio gruppo di ricerca ha concentrato la sua attenzione su quest'importante via metabolica. Infatti, è stato in grado di dimostrare come, mutazioni a carico del gene MTHFR in madri portatrici delle varianti polimorfiche C677T e A1298C, aumentino il rischio di generare figli affetti da NSCL/P (Martinelli, et al., 2001; Pezzetti, et al., 2004). Valori di associazione significativa sono stati riscontrati anche tra la NSCL/P e alcuni polimorfismi a carico del gene della transcobalamina 2 (TCN2), che ha il compito di trasportare attraverso il circolo ematico la vitamina B12 (cobalamina) (Martinelli, et al., 2006) e del gene Cistationina  $\beta$  sintasi (CBS), una liasi vitamina B-dipendente che produce cistationina dalla condensazione dell'omocisteina con la serina, riducendo così i livelli di omocisteina plasmatica (Martinelli, et al., 2011). Lo stesso gruppo, ha anche escluso il coinvolgimento dei recettori FOLR1 e FOLR2 nell'eziologia della malformazione (Scapoli, et al., 2005a).

Sulla base dei risultati finora ottenuti è stato possibile confermare come la via metabolica del folato rivesta un ruolo chiave nello sviluppo oro-facciale e come mutazioni a carico dei geni che codificano per gli enzimi che intervengono in questa cascata metabolica possano essere considerati possibili fattori di suscettibilità per la NSCL/P.

Procedendo in quest'ottica ho voluto estendere l'indagine ad altri due geni che, in modo diverso, agiscono nell'ambito della via metabolica del folato: il gene RFC1 ed il gene DHFR (Figura 7).



**Figura 7.** Via metabolica dell'acido folico.

#### 4.1.1 RFC1

L'assorbimento intracellulare del folato è un processo fondamentale che prevede l'intervento di un carrier, ovvero, una proteina di membrana codificata dal gene reduced folate carrier 1 (RFC1), anche conosciuto come solute carrier family 19 (SLC19A1) mappante nella regione 21q22.2-22.3.

Nello specifico, il ruolo dell'RFC1 è quello di trasportare la forma metabolicamente attiva del folato, il 5-metiltetraidrofolato, all'interno della cellula; pertanto, mutazioni a carico del gene possono down-regolare la sua attività abbassando i livelli di folato intracellulare, ed aumentando indirettamente la concentrazione di omocisteina plasmatica (James, et al., 2010; Stanislawski-Sachadyn, et al., 2009).

In passato questo gene è stato visto essere implicato nell'insorgenza di difetti congeniti quali la spina bifida (Shaw, et al., 2002; Pei, et al., 2006). Le implicazioni genetiche in questo difetto sono state spesso fonte di ispirazione per studiosi delle schisi orofacciali, in virtù della comune origine embrionale delle due strutture.

Lo studio di una eventuale associazione allelica tra il polimorfismo A80G nel gene RFC1 e la NSCL/P ha prodotto risultati contrastanti (Shaw, et al., 2003; Vieira, et al., 2005; Mostowska, et al., 2006; Pei, et al., 2006) e resta ancora da chiarire come questa variante,

presente nelle madri, possa essere in grado di aumentare il rischio di NSCL/P nei probandi (Wang, et al., 2009).

In quest'indagine sono state investigate 404 triadi italiane composte da probandi affetti da NSCL/P e dai loro genitori.

Per la selezione dei polimorfismi ho preso in considerazione la variante missenso rs1051266 (G80A) nell'esone 2, in quanto in un lavoro presente in letteratura è stata proposta come fattore di rischio per la NSCL/P (Vieira, et al., 2008). Inoltre, utilizzando il software "Life Technologies SNPbrowser" (Life Technologies, Foster City, CA), ho selezionato altri due polimorfismi informativi: rs4818789 e rs3788205.

Il polimorfismo rs4818789 è localizzato all'interno di un introne, 8,9 kb a monte del polimorfismo non sinonimo, mentre il polimorfismo rs3788205 mappa vicino alla regione 5'-UTR, 6,5 kb a valle dell'rs1051266.

La genotipizzazione è stata eseguita utilizzando l'ABI PRISM<sup>®</sup> 7500 Real-Time PCR e sfruttando il metodo delle sonde TaqMan<sup>®</sup> in conformità alle linee guida del produttore (Life Technologies, Monza, Italia).

Per ogni SNP considerato, le frequenze genotipiche dei probandi e dei genitori si sono distribuite secondo la legge dell'equilibrio di Hardy-Weinberg e non sono stati rilevati errori mendeliani.

L'associazione allelica tra i tre *loci* polimorfici e la malattia è stata valutata utilizzando il programma FBAT v1.7.3 (Horvath, et al., 2001). I risultati, riportati in Tabella 9 mostrano un livello di associazione ai limiti della significatività statistica per due dei tre marcatori indagati.

Marker	dbSNP ID	Posizione genomica	Alleli	MAF	Z score	P value
1	rs3788205	chr21:46964378	A/G	0.3	1,919	0,055
2	rs1051266	chr21:46957794	A/G	0.44	-0,426	0,67
3	rs4818789	chr21:46948827	A/C	0.24	1,934	0,053

**Tabella 9.** Analisi di associazione tra marcatori e malattia.

Tre degli aplotipi analizzati mostrano una trasmissione ai probandi distorta. Infatti, l'aplotipo h1 è risultato over-trasmesso ( $P = 0,038$ ), mentre gli aplotipi h7 e h8 sono sotto-trasmessi ai figli ( $P = 0,018$  e  $P = 0,30$  rispettivamente) (Tabella 10). Normalmente, un aplotipo sotto-trasmesso potrebbe offrire protezione da una malattia, al contrario degli

aplotipi over-trasmessi. Tuttavia, la significatività statistica viene persa in seguito alla correzione per test multipli effettuata con il metodo di Bonferroni.

Aplotipo	SNP			freq	P	P <sub>post correzione</sub>
	1	2	3			
h1	g	a	t	0,30	0,038	0,304
h2	a	a	t	0,24	0,176	1,0
h3	g	g	g	0,19	0,688	1,0
h4	g	g	t	0,18	0,198	1,0
h5	a	g	g	0,03	0,128	1,0
h6	a	g	t	0,03	0,864	1,0
h7	g	a	g	0,02	0,018	0,144
h8	a	a	g	0,01	0,030	0,240

**Tabella 10.** Analisi di associazione degli aplotipi.

Complessivamente, dai dati ottenuti si può ipotizzare la presenza di una debole associazione tra i polimorfismi dell’RFC1 e la NSCL/P nella popolazione italiana. I nostri dati, quindi, confermano quelli già presenti in letteratura secondo cui RFC1 può essere considerato un fattore di suscettibilità nell’insorgenza delle schisi orofacciali (Vieira, et al., 2008).

#### 4.1.2 DHFR

Il gene DHFR in posizione 5q11.2-q13.2, codifica per la diidrofolato reduttasi (DHFR), un enzima ubiquitario che catalizza la riduzione dell’acido diidrofolicco a tetraidrofolicco, il quale agisce da veicolatore di unità monocarboniose in vari processi metabolici, quali la biosintesi delle purine, dell’acido timidilico e di alcuni aminoacidi.

E' stato riportato che madri esposte all'azione di inibitori della diidrofolato reduttasi (es.: carbamazepina, fenitoina, fenobarbital, primidone) nel primo trimestre di gravidanza raddoppiano il rischio di generare prole affetta da schisi orofacciale (Hernandez-Diaz, et al., 2000). Ad oggi, non ci sono in letteratura studi che valutino il ruolo del DHFR nella NSCL/P; così, in quest’occasione abbiamo voluto verificare se i polimorfismi presenti su questo gene possano influenzare il rischio di NSCL/P.

In questo studio di associazione basato su nuclei famigliari sono state prese in considerazione 400 triadi Italiane di pazienti affetti da NSCL/P con i loro genitori.



La selezione dei polimorfismi da utilizzare nello studio di associazione allelica è stata eseguita utilizzando il software Haploview (Barrett, et al., 2005), sfruttando le mappe di LD elaborate dal consorzio internazionale per il progetto Hapmap e valutando la MAF, l'eterozigosità e la variazione aminoacidica che lo SNP poteva comportare.

I 4 SNPs informativi che il software ci ha fornito (rs380691, rs11742668, rs1677693 e rs1650723) sono risultati sufficienti a coprire l'informazione sull'intero gene oltre ad, ulteriori 20 Kb di sequenze a monte e a valle dello stesso.

Anche in questo caso, la tipizzazione è stata eseguita utilizzando l'ABI PRISM® 7500 Real-Time PCR, sfruttando il metodo delle sonde TaqMan®.

L'analisi delle frequenze genotipiche dei probandi e dei genitori si sono distribuite secondo la legge dell'equilibrio di Hardy-Weinberg e non sono stati rilevati errori mendeliani.

L'analisi condotta mediante il Transmission Disequilibrium Test (TDT) (Spielman, et al., 1993) (Tabella 11) e mirata a verificare l'eventuale coinvolgimento dei polimorfismi del gene DHFR nell'eziologia della NSCL/P, ha indicato un unico polimorfismo come associato alla malattia, anche se con un valore borderline ( $P = 0,049$ ): lo SNP con ID rs1677693. Inoltre, la variante allelica A di tale marcatore sembra ridurre di 0,8 volte il rischio di CL/P (OR = 0,80; CI 95% 0,64-0,99), supportando i risultati del precedente lavoro di Parle-McDermott e colleghi, nel quale è stato evidenziato che madri presentanti il polimorfismo di delezione di 19bp nell'introne 1 del gene DHFR manifestavano un rischio ridotto di avere figli affetti da NTD (Parle-McDermott, et al., 2007).

SNP	Allele	T	NT	T-Freq	NT-Freq	$\chi^2$	P	OR (95% CI)
rs380691	T	529	524	0,72	0,72	0,09	0,766	ref. 0,97 (0,76-0,22)
	C	201	206	0,28	0,28			
rs11742668	C	689	691	0,94	0,95	0,05	0,816	ref. 1,06 (0,67-1,70)
	T	41	39	0,06	0,05			
rs1677693	C	506	471	0,70	0,65	3,86	0,049	ref. 0,80 (0,64-0,99)
	A	222	257	0,30	0,35			
rs1650723	G	579	573	0,80	0,79	0,16	0,690	ref. 0,95 (0,73-1,20)
	A	145	151	0,20	0,21			

**Tabella 11.** Analisi di associazione tra gli alleli dei polimorfismi e la malattia.

L'analisi degli aplotipi al locus DHFR confermano l'associazione con la malattia. In Tabella 12 sono indicati gli aplotipi che hanno fornito valori di associazione significativi. In particolare, l'aplotipo rs1677693 (A) - rs1650723 (G) ha presentato il grado di associazione più significativo con un OR di 0,64 (CI 95% 0,47-0,86) ( $P = 0,006$ ).

Aplotipo	T	NT	T-Freq	NT-Freq	$\chi^2$	P	OR (95% C.I.)
C-G	478,5	434,9	0,68	0,62	5,75	0,016	ref.
C-A	11,5	19,1	0,02	0,03	1,76	0,185	0,53 (0,24-1,16)
A-G	86,5	124,1	0,12	0,18	7,52	0,006	0,64 (0,47-0,86)
A-A	129,5	127,9	0,18	0,18	0,00	0,950	0,92 (0,70-1,23)

**Tabella 12.** Analisi degli aplotipi per la combinazione dei marcatori rs1677693 (A) e rs1650723 (G).

I risultati riportati nella presente indagine ci hanno indotti ad attribuire un ruolo all'enzima codificato dal gene DHFR nella NSCL/P. Tali risultati rappresentano, ad oggi, il primo tentativo di ricondurre ed attribuire un ruolo all'enzima codificato dal gene DHFR nella NSCL/P. Per rafforzare questa ipotesi di associazione tra il gene d'interesse e la patologia, sono sicuramente necessari ulteriori studi di replicazione.

## 4.2 ANALISI GENETICA DI 15 *LOCI* DI RISCHIO PER LA NSCL/P

Negli ultimi anni, diversi studi hanno portato ad identificare un gran numero di geni candidati e *loci* che potrebbe contribuire allo sviluppo della NSCL/P.

Uno dei primi fattori di rischio genetico identificato è stato il gene IRF6, sul cromosoma 1q32.2, che codifica per il Fattore di Regolazione dell'Interferone 6 (Zuccherro, et al., 2004). Studi condotti sull'uomo hanno confermato un'associazione tra polimorfismi presenti in questo gene e forme non sindromiche di CL/P (Zuccherro, et al., 2004; Rahimov, et al., 2008); in particolare, un'indagine condotta da Rahimov e colleghi ha portato all'identificazione di un polimorfismo, localizzato nel promotore del gene IRF6, che disattiva il sito di legame per il fattore di trascrizione AP-2 $\alpha$  (Rahimov, et al., 2008). Questa scoperta, rafforzata dalla concordanza di risultati emersi dai diversi studi incentrati su questo gene rende IRF6 uno dei più significativi fattori di rischio genetico per le schisi non sindromiche.

Studi di *linkage* hanno inoltre identificato una nuova regione sul cromosoma 9q22 quale possibile *locus* di rischio (Marazita, et al., 2004) e studi funzionali hanno supportato l'ipotesi che il gene FOXE1 svolga un ruolo cruciale nella NSCL/P (Marazita, et al., 2009; Moreno, et al., 2009). FOXE1 è un membro della famiglia dei fattori di trascrizione con dominio a forcina ed alcune delle sue mutazioni sono risultate associate alla sindrome di Bamford-Lazarus che include, fra le sue caratteristiche, anche la schisi del palato (Jugessur, et al., 2009).

Oltre all'approccio del gene candidato, studi di associazione condotti sull'intero genoma (GWAS) hanno identificato altri cinque *loci* di suscettibilità per la NSCL/P: 1p22, 8q24, 10q25, 17q22 e 20q12 (Birnbaum, et al., 2009; Grant, et al., 2009; Beaty, et al., 2010; Mangold, et al., 2010).

Una recente meta-analisi condotta da Ludwig e colleghi su due indipendenti studi GWAS, ha portato all'identificazione di altri 6 *loci* di suscettibilità per la NSCL/P: 1p36, 2p21, 3p11, 8q21, 13q31 e 15q22 (Ludwig, et al., 2012); altri due *loci*: 3q12 e 17p13 sono stati infine identificati da Beaty e colleghi (Beaty, et al., 2013).

In totale, sono stati selezionati 15 differenti regioni cromosomiche con una forte implicazione nello sviluppo della NSCL/P. La maggior parte di questi *loci* candidati è stata identificata in studi genetici condotti su popolazioni Europee ad Asiatiche e le evidenze ottenute per alcuni di questi *loci* sono state replicate in campioni di studio appartenenti ad altre etnie (Nikopensius, et al., 2009; Beaty, et al., 2010; Blanton, et al., 2010; Mostowska, et al., 2010; Rojas-Martinez, et al., 2010; Brito, et al., 2012).

Tra le regioni indagate, il *locus* di rischio 8q24, ha mostrato un forte segnale di associazione nell'ambito della popolazione Europea; i *loci* 1p22 e 20q12, hanno invece evidenziato una prevalente associazione in pazienti asiatici affetti dalla malformazione.

Nel laboratorio di ricerca della Dott.ssa Elisabeth Mangold (Institute of Human Genetics) dell'Università di Bonn, dove ho trascorso un periodo formativo di 6 mesi durante il terzo anno di Dottorato, era già stata valutata l'associazione tra la malattia e queste 15 regioni cromosomiche su un campione rappresentativo della popolazione Araba (Aldhorae, et al., 2014).

Abbiamo quindi deciso di replicare quest'analisi prendendo in considerazione il mio campione di studio rappresentativo della popolazione Italiana, utilizzando la piattaforma Sequenom MassARRAY® e LightCycler®-TaqMan.

La Tabella 13 mostra i polimorfismi già selezionati dal gruppo di ricerca della Dott.ssa Mangold per le 15 regioni cromosomiche viste essere implicate nello sviluppo della NSCL/P.

Chr	SNP ID	Geni +/- 100 Kb	Studio iniziale
1p36	rs11583072	PAX7	(Ludwig, et al., 2012)
	rs742071		
1p22	rs560426	ABCA4, ARHGAP29	(Beaty, et al., 2010)
1q32	rs861020	IRF6	(Rahimov, et al., 2008)
	rs642961		
2p21	rs7590268	ZFP36L2, THADA	(Ludwig, et al., 2012)
3p11	rs7632427	EPHA3	(Ludwig, et al., 2012)
3q12	rs1384062	COL8A1, FILIP1L	(Beaty, et al., 2013)
8q21	rs12543318	DCAF4L2	(Ludwig, et al., 2012)
	rs1911665		
8q24	rs17241253	a	(Birnbbaum, et al., 2009)
	rs987525		
9q22	rs3758249	FOXE1, C9orf156, HEMGN	(Moreno, et al., 2009)
	rs4460498		
10q25	rs7078160	KIAA1598, VAX1	(Mangold, et al., 2010)
	rs4752028		
13q31	rs8001641	a	(Ludwig, et al., 2012)
15q22	rs1873147	TPM1	(Ludwig, et al., 2012)
17p13	rs1880646	PIK3R5, NTN1	(Beaty, et al., 2013)
	rs9891446		

17q22	rs17760296	NOG	(Mangold, et al., 2010)
	rs227731		
20q12	rs11696257	MAFB	(Beaty, et al., 2010)

**Tabella 13.** Elenco dei 15 *loci* di rischio conosciuti per la NSCL/P.

<sup>a</sup> nessun gene è presente nell'intervallo considerato.

Per ogni SNP indagato, le frequenze genotipiche dei probandi e dei genitori si sono distribuite secondo la legge dell'equilibrio di Hardy-Weinberg.

L'analisi di associazione per ogni singolo marcatore, condotta mediante TDT e l'impiego del software FAMHAP (Becker and Knapp, 2004), in seguito alla correzione per test multipli effettuata con il metodo di Bonferroni ha fornito i seguenti risultati (Tabella 14):

Informazioni SNP				Trasmissione alleli		Associazione $P$		Rischio relativo (95% CI)	
SNP ID	Locus	Posizione SNP (hg19)	Alleli	T	NT	$\chi^2$	$P_{TDT}$	$RR_{het}$	$RR_{hom}$
rs11583072	1p36	18,966,007	G/T	137	171	3,75	0,05	1,38 (0,98-1,94)	1,55 (0,98-2,45)
rs742071	1p36	18,979,874	G/T	135	168	3,59	0,06	1,34 (0,95-1,90)	1,55 (0,98-2,44)
<b>rs560426</b>	1p22	94,553,438	A/G	130	198	14,1	<b><math>1,74 \times 10^{-4}</math></b>	1,29 (0,89-1,87)	2,22 (1,43-3,45)
rs861020	1q32	209,977,111	A/G	101	71	5,23	<b>0,02</b>	1,35 (0,95-1,91)	2,38 (1,09-5,21)
rs642961	1q32	209,989,270	A/G	98	69	5,04	<b>0,02</b>	1,38 (0,97-1,96)	2,22 (1,00-4,94)
rs7590268	2p21	43,540,125	G/T	129	119	0,4	0,53	1,09 (0,80-1,49)	1,17 (0,66-2,05)
rs7632427	3p11	89,534,377	C/T	133	137	0,06	0,81	0,85 (0,53-1,34)	0,96 (0,58-1,60)
rs1384062	3q12	99,597,928	G/T	98	133	5,3	<b>0,02</b>	1,93 (0,99-3,79)	2,37 (1,17-4,80)
rs12543318	8q21	88,868,340	A/C	128	165	4,67	<b>0,03</b>	1,09 (0,78-1,52)	1,70 (1,08-2,69)
rs1911665	8q21	88,896,480	C/T	157	133	1,99	0,16	1,01 (0,74-1,38)	1,52 (0,95-2,42)
<b>rs17241253</b>	8q24	129,890,188	C/T	145	79	19,45	<b><math>1,03 \times 10^{-5}</math></b>	1,63 (1,15-2,31)	3,75 (2,10-6,67)
<b>rs987525</b>	8q24	129,946,154	A/C	160	89	20,24	<b><math>6,81 \times 10^{-6}</math></b>	1,51 (1,08-2,13)	3,60 (2,12-6,13)
rs3758249	9q22	100,614,140	A/G	153	156	0,03	0,86	0,89 (0,61-1,28)	1,01 (0,65-1,57)
rs4460498	9q22	100,620,412	C/T	155	159	0,05	0,82	0,89 (0,64-1,22)	1,09 (0,71-1,69)
rs7078160	10q25	118,827,560	A/G	101	74	4,17	<b>0,04</b>	1,43 (1,00-2,03)	1,67 (0,78-3,58)
rs4752028	10q25	118,834,991	C/T	100	79	2,46	0,12	1,37 (0,97-1,94)	1,31 (0,61-2,83)
rs8001641	13q31	80,692,811	A/G	148	141	0,17	0,68	0,99 (0,70-1,41)	1,10 (0,70-1,75)
rs1873147	15q22	63,312,632	C/T	100	103	0,04	0,83	1,05 (0,55-2,03)	1,08 (0,53-2,17)
rs1880646	17p13	8,929,845	C/T	111	129	1,35	0,25	1,39 (0,79-2,47)	1,52 (0,82-2,83)
rs9891446	17p13	8,935,416	C/G	89	109	2,02	0,16	1,37 (0,98-1,90)	1,17 (0,58-2,36)
rs17760296	17q22	54,615,617	G/T	64	68	0,12	0,73	1,15 (0,47-2,81)	1,20 (0,47-3,05)

rs227731	17q22	54,773,238	A/C	135	145	0,36	0,55	1,12 (0,82-1,54)	1,12 (0,68-1,84)
rs11696257	20q12	39,270,816	C/T	144	139	0,09	0,77	1,22 (0,81-1,84)	1,13 (0,70-1,85)
rs13041247	20q12	39,269,074	C/T	135	145	0,36	0,55	1,29 (0,85-1,96)	1,23 (0,75-2,02)

**Tabella 14.** Risultati di associazione per i 15 *loci* genici nel campione di studio NSCL/P Italiano.

Dall'analisi è possibile evidenziare una associazione significativa per i marcatori rs987525 ( $P_{TDT} = 6,81 \times 10^{-6}$ ) ed rs17241253 ( $P_{TDT} = 1,03 \times 10^{-5}$ ) al locus 8q24; associazione significativa è stata osservata anche per il marcatore rs560426 ( $P_{TDT} = 1,74 \times 10^{-4}$ ) al locus 1p22.

Nel 2009, per la prima volta, Birnbaum e colleghi, tramite uno studio GWAS, hanno identificato nella popolazione Europea, una regione di circa 640 kb (regione di deserto genico) al locus cromosomico 8q24.21, all'interno della quale lo SNP rs987525 A>C rappresenta il marker con la maggiore significatività di associazione (Birnbaum, et al., 2009). Tale risultato è stato confermato successivamente da diversi studi indipendenti, in un certo numero di differenti etnie (Grant, et al., 2009; Beaty, et al., 2010; Mangold, et al., 2010; Mostowska, et al., 2010; Rojas-Martinez, et al., 2010 ; Brito, et al., 2012). L'indagine che ho intrapreso ha confermato la stessa associazione anche per quanto riguarda la popolazione Italiana.

Il secondo SNP al locus 8q24, rs17242353, ha mostrato una più forte associazione rispetto allo SNP rs987525, come indicato dai valori di rischio relativo. Questo suggerisce che, nel campione Italiano, la variante causale ancora sconosciuta presente nel locus 8q24, potrebbe essere più vicina allo SNP rs17242353.

In un recente studio condotto su embrioni murini, la regione ortologa di 280 Kb adiacente allo SNP rs987525 è stata identificata come potenziale regione coinvolta nell'induzione delle schisi craniofacciali, suggerendo così un probabile effetto regolatore che può costituire il meccanismo alla base dell'insorgenza della patologia, influenzato dall'aplotipo (Uslu, et al., 2014).

Oltre che per il locus 8q24, presenza di un'associazione significativa è stata osservata anche per il marcatore rs560426 al locus 1p22. Tale marcatore è localizzato in una regione intronica di ABCA4 (ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 4), vicino al gene ARHGAP29. Alcuni studi hanno dimostrato che *Arhgap29* è espresso durante lo sviluppo craniofacciale nel modello murino e differenti mutazioni a suo carico sono state riscontrate in pazienti con NSCL/P, suggerendo l'importanza di questo gene nell'eziologia della malformazione (Leslie, et al., 2012; Letra, et al., 2014). Nonostante la mancanza di una

relazione funzionale diretta di rs560426 sia con ABCA4 che con ARHGAP29, molti studi GWAS e di meta-analisi hanno dimostrato una forte associazione genetica tra le mutazioni al locus 1p22 e la malformazione, nelle popolazioni Brasiliana (Fontoura, et al., 2012), Ispanica (Yuan, et al., 2011) e Colombiana (Lennon, et al., 2012); nessuna associazione è stata riscontrata, invece, per quanto riguarda la popolazione Europea (Yuan, et al., 2011; Bohmer, et al., 2013). La forte associazione evidenziata nel mio studio sottolinea ulteriormente l'importanza di questo *locus* nella NSCL/P, estendendo il suo spettro d'azione anche alla popolazione Italiana.

Cinque SNPs addizionali, rs861020 ( $P_{TDT} = 0,02$ ) ed rs642961 ( $P_{TDT} = 0,02$ ) presenti sul locus 1q32, rs1384062 ( $P_{TDT} = 0,02$ ) al locus 3q12, rs7078160 ( $P_{TDT} = 0,04$ ) al locus 10q25 e rs12543318 ( $P_{TDT} = 0,03$ ) al locus 8q21 hanno mostrato una significatività nominale di associazione; due SNPs, presenti sul locus 1p36, hanno invece evidenziato un trend di significatività.

Per gli altri 8 SNPs indagati non è stata dimostrata associazione significativa con la malattia, per il campione NSCL/P Italiano. Questa mancata evidenza di correlazione con la malattia può essere attribuita alle ridotte dimensioni del campione utilizzato nello studio o al fatto che i polimorfismi analizzati non sono espressi nella popolazione italiana a causa di una diversa struttura aplo-tipica presente nella popolazione Europea.

In sintesi, i miei dati migliorano la comprensione nell'ambito della NSCL/P, mettendo in evidenza l'importante ruolo del locus 8q24 nel determinare la suscettibilità alla malattia anche nella popolazione Italiana. Inoltre, i miei risultati dimostrano un significativo coinvolgimento del locus 1p22. Ulteriori studi saranno necessari per confermare l'associazione tra le varianti genetiche di tutti questi *loci* e la NSCL/P anche nell'ambito di altri gruppi etnici.

### 4.3 STUDIO DEL RUOLO DEL COMPLESSO POLYCOMB NEL DETERMINARE LA NSCL/P

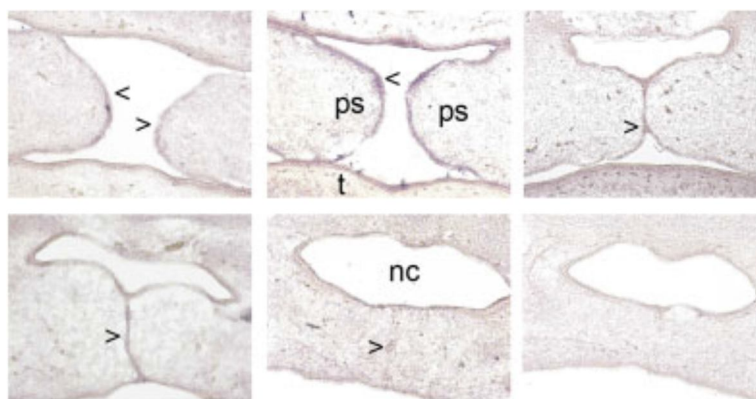
Nel corso degli anni, studi di *linkage* e di associazione hanno permesso di identificare un certo numero di geni e *loci*, candidati a conferire predisposizione alla NSCL/P. Le regioni cromosomiche ed i geni effettivamente identificati quali responsabili dell'insorgenza di questa complessa ed eterogenea malformazione sono elencati e descritti nel database [Online Mendelian Inheritance in Man \(OMIM - http://www.omim.org\)](http://www.omim.org).

Tra queste, una delle più indagate è stata la regione situata sul braccio corto del cromosoma 6, in seguito definita OFC1.

Già nel 1987, lo studio condotto da Eiberg e colleghi, ha dimostrato un'associazione significativa tra il fattore XIII della coagulazione, che mappa nella regione 6p24-23, e la LPS (Eiberg, et al., 1987). Inoltre, aberrazioni cromosomiche in questa specifica regione sono state correlate all'insorgenza della malformazione (Moreno, et al., 2004).

L'analisi condotta in precedenza dal mio gruppo di ricerca sulla popolazione italiana, ha evidenziato la presenza di *linkage* per un marcatore microsatellite, nel 60% delle famiglie indagate, oltre alla presenza di eterogeneità genetica (Scapoli, et al., 1997).

Più recentemente, nel tentativo di identificare il gene effettivamente responsabile dell'aumento di rischio di manifestare la NSCL/P, lo stesso gruppo ha condotto, in collaborazione con altri colleghi, esperimenti di espressione genica, in embrioni di topo, utilizzando la tecnica dell'ibridazione dell'mRNA *in situ*. Ha così potuto evidenziare che *Jarid2* è altamente e specificamente espresso a livello delle cellule epiteliali delle lamine palatine durante i processi di fusione, ovvero intorno al giorno E14.5 di sviluppo embrionale murino (Figura 8), per poi decrescere fino a scomparire subito dopo la loro fusione (Scapoli, et al., 2010).



**Figura 8.** Ibridazione *in situ*. Espressione di *Jarid2* a livello delle lamine palatine nel topo al giorno E14.5 ed E15.5 di sviluppo embrionale. Il segnale d'ibridazione risulta massimo lungo il margine antero-posteriore delle



lamine palatine (ps) durante i processi di fusione, per poi decrescere fino a scomparire al termine del processo di fusione al giorno E15.5.

Ps. Lamina palatina; nc. Cavità nasali; t. Lingua (Scapoli, et al., 2010).

Lo studio di *linkage disequilibrium* basato su nuclei familiari (triadi) ha inoltre evidenziato associazione allelica tra JARID2 e NSCL/P supportando ulteriormente un ruolo per questo gene nell'eziologia della malformazione (Scapoli, et al., 2010).

#### 4.3.1 JARID2

Il gene JARID2, anche conosciuto come JMJ o Jumonji presenta il 90% delle analogie con il gene murino; appartiene alla famiglia delle dimetilasi istoniche JmjC, proteine contenenti un dominio Jumonji C necessario per catalizzare la rimozione dei gruppi metilici da specifici residui di lisina sulle code degli istoni.

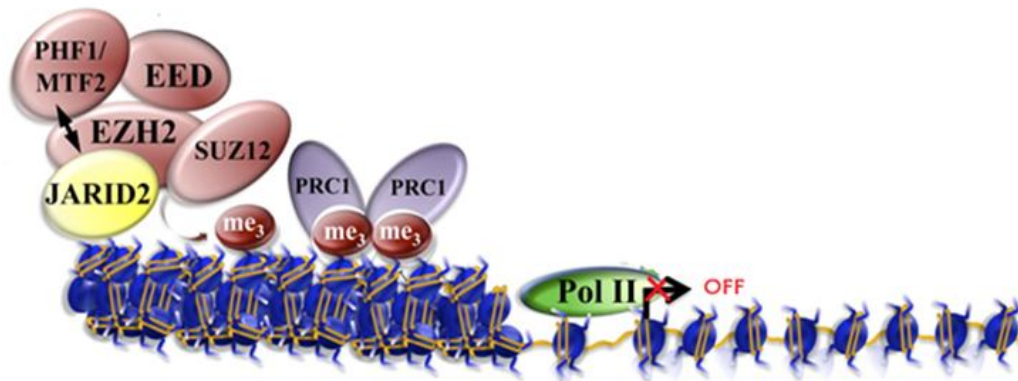
Oltre al dominio JmjC il gene presenta un dominio JmjN, un dominio AT-Rich (ARID) che ha un ruolo importante nello sviluppo embrionale, nella regolazione del ciclo cellulare e nel rimodellamento della cromatina (Jung, et al., 2005) ed infine un dominio funzionale Zn-finger in grado di legare il DNA e mediare il segnale di localizzazione nucleare (Takeuchi, et al., 1995; Takeuchi, et al., 2006; Landeira, et al., 2011).

Sebbene la sua funzione sia tuttora oggetto di studio, è stato osservato che mutazioni in omozigosi a carico del gene sono spesso letali nei topi tra E10.5 e E15.5 in quanto determinano un insufficiente sviluppo cardiaco e neurale (Jung, et al., 2005). Questo permette di sottolineare l'importante ruolo del gene nello sviluppo del cuore e del fegato, nella chiusura del tubo neurale e nell'ematopoiesi (Olson, 2004). Sebbene la schisi non figuri tra le caratteristiche di questi topi knockout, resta il fatto che sviluppo cardiaco ed orofacciale condividono pathways molecolari comuni, ipotesi supportata dall'evidenza che difetti cardiaci e schisi labiopalatina (CL/P) o del solo palato sono tratti che frequentemente si riscontrano concomitanti, in sindromi congenite (ad oggi, più di 180 entries in OMIM).

Recentemente, è stato evidenziato che JARID2 interagisce con il Polycomb-Repressive Complex 2 (PRC2) nel regolare il pattern di espressione di geni dello sviluppo attraverso la modificazione dello stato della cromatina (Peng, et al., 2009; Pasini, et al., 2010) (Figura 9).

Nello specifico, si crede che l'aumento dell'espressione di JARID2 osservato nelle cellule epiteliali delle lamine palatine che si approssimano alla fusione, richiami il complesso

PRC2 che, reprimendo la trascrizione genica, favorisce la transizione epitelio-mesenchimale (EMT).



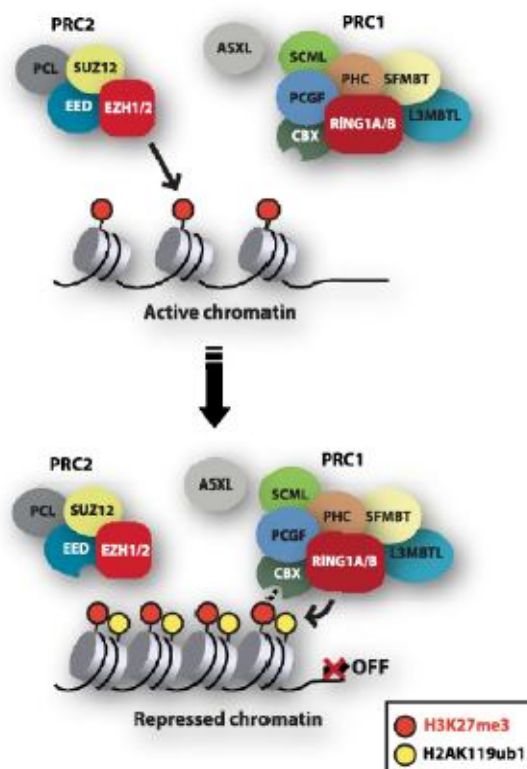
**Figura 9.** Regolazione della trascrizione mediata dal complesso JARID2-PRC2 (Herz and Shilatifard, 2010).

Le funzioni di JARID2 nel legame con il complesso PRC2 non sono ancora del tutto chiare, con evidenze contrastanti ottenute dai vari studi. Infatti, alcuni di questi hanno evidenziato che l'interazione tra JARID2 ed il PRC2 inibisce l'attività metiltransferasica H3K27me3 di PRC2 (Shen, et al., 2009), mentre altri hanno rilevato che JARID2 favorisce la localizzazione di PRC2 sui target genomici (Li, et al., 2010; Pasini, et al., 2010).

#### 4.3.2 Il complesso Polycomb

Il complesso Polycomb (PcG) definisce un set di geni codificanti per una famiglia di proteine che insieme formano complessi multiproteici in grado di rimodellare la cromatina. Questi complessi agiscono prevalentemente da repressori trascrizionali a carico di migliaia di geni e decine di pathways coinvolti nello sviluppo e nella differenziazione cellulare. Sono tra l'altro coinvolti in processi quali: il controllo del ciclo cellulare, la senescenza, l'inattivazione del cromosoma X, l'omeostasi dei tessuti, la tumorigenesi e la regolazione del differenziamento delle cellule staminali (Martinez and Cavalli, 2006; Wu and Bernstein, 2008; Surface, et al., 2010; Piunti and Pasini, 2011; Pontier and Gribnau, 2011; Prezioso and Orlando, 2011). La delezione di geni codificanti per elementi di PcG in modelli sperimentali porta a letalità in utero, evidenziando il loro ruolo cruciale durante lo sviluppo embrionale (O'Carroll, et al., 2001).

Nei mammiferi esistono due principali complessi Polycomb: Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) e 2 (PRC2) (Figura 10).



**Figura 10.** Compattazione della cromatina per azione dei complessi PRC1 e PRC2 (Sauvageau and Sauvageau, 2010).

#### ✧ PRC1

È stato il primo dei due complessi ad essere isolato in *Drosophila melanogaster* più di 50 anni fa (Sandler, et al., 1968).

Nei mammiferi, il complesso PRC1 è costituito da 4 subunità principali: le proteine CBX (Cbx2-4-6-7-8), Ring1 (Ring1A/B), PHC (PHC1-3) e PCGF (PCGF1-6) (Levine, et al., 2002). La diversa combinazione di queste subunità è in grado di generare diversi complessi PRC1. In aggiunta a queste quattro subunità formanti il *core* proteico, altre proteine si associano al complesso come ad esempio BCOR, che interviene nell'ubiquitinazione dell'istone H2A.

Il complesso PRC1, una volta legata la cromatina, la compatta, catalizzando la monoubiquitinazione della lisina 119 dell'istone H2A attraverso l'ubiquitina ligasi E3 di RING1A e RING1B (Wang, et al., 2004) (Figura 10). L'importanza di queste due proteine è stata ben dimostrata in letteratura. Nello specifico, è stato sottolineato che topi knockout per la proteina RING1A presentano difetti a livello scheletrico mentre, la perdita di RING1B, provoca letalità embrionale (Lorente, et al., 2000; Voncken, et al., 2003).

## ✧ PRC2

Il complesso *core* di PRC2, conservato dalla *Drosophila* fino ai mammiferi, è formato da quattro subunità: EZH1/2, SUZ12, EED e RbAp46/48 (Margueron and Reinberg, 2011).

Le proteine EZH1/2 sono le responsabili della di- e tri-metilazione dell'istone H3 a livello della lisina 27 (H3K27me3) reprimendo così la trascrizione dei geni (Schuettengruber and Cavalli, 2009; Sauvageau and Sauvageau, 2010). Successivamente, l'H3K27me3 è riconosciuto dalle proteine CBX del complesso PRC1 che viene così reclutato sulla cromatina (Figura 10). Nonostante l'alto grado di omologia, EZH1 ed EZH2 sono espressi in diverse fasi del ciclo cellulare ed hanno differenti pattern di espressione: EZH1 è presente nelle cellule differenziate mentre EZH2 si trova nelle cellule in attiva divisione. Il ruolo cruciale svolto da EZH2 è dimostrato dal fatto che topi *Ezh2*-null muoiono in utero, mentre topi *Ezh1*-null non hanno difetti evidenti, probabilmente grazie alla funzione compensatoria di *Ezh2*. Comunque, EZH1 può in parte compensare la perdita di EZH2, poiché la perdita di entrambi provoca conseguenze maggiori rispetto alla sola perdita di EZH2 (Yoo and Hennighausen, 2012).

EZH2 presenta un SET-domain nel quale, sia la parte C-terminale sia la zona CXC (ricca in cisteine) sono richieste per l'attività istone-metiltransferasica, mentre la porzione N-terminale fornisce i siti di legame per l'assemblaggio con le altre subunità; infatti, per svolgere la sua funzione, EZH2 deve essere complessato con le subunità non catalitiche, EED, SUZ12 e RbAp46/48, che ne favoriscono il legame al nucleosoma (Kuzmichev, et al., 2002; Nekrasov, et al., 2005).

La subunità EED (Embryonic Ectoderm Development) presenta 4 diverse isoforme e funziona da proteina scaffold unendo fisicamente EZH2 e gli istoni H3 (Montgomery, et al., 2007), mentre SUZ12 (Suppressor of Zeste) è importante per il riconoscimento del nucleosoma e per la stabilità di EZH2 (Shen, et al., 2008). Infine, del complesso fanno parte anche le proteine RbAp46/48 (Retinoblastoma-associated protein 46 e 48) anche conosciute come RBBP7/4 (Figura 10).

PRC2 è coinvolto in una varietà di processi biologici che includono il differenziamento, il mantenimento dell'identità cellulare e la proliferazione, oltre alla plasticità delle cellule staminali.

Oltre alle quattro componenti del *core*, altri fattori interagiscono con il complesso (Cao and Zhang, 2004; Nekrasov, et al., 2007; Sarma, et al., 2008; Kim, et al., 2009; Herz and Shilatifard, 2010 ; Li, et al., 2010; Hunkapiller, et al., 2012):

- AEBP2 (proteina zing finger), che interagisce con alcuni componenti di PRC2 per aumentare l'attività catalitica;
- PCLs (PCL1, PCL2 e PCL3), che condividono gli stessi motivi proteici e interagiscono con PRC2 attraverso EZH2 e SUZ12. Questi svolgono differenti funzioni che vanno dalla regolazione dell'attività enzimatica di PRC2 al reclutamento di PRC2 sui suoi geni target;
- JARID2 che, come già descritto in precedenza, interagisce con la subunità EZH2 di PRC2 (Peng, et al., 2009; Shen, et al., 2009; Landeira, et al., 2010; Li, et al., 2010; Pasini, et al., 2010) e migliora l'attività del complesso PRC2 sotto definite condizioni biochimiche.

Questi fattori non sono strettamente necessari per l'attività di PRC2 *in vitro* quindi si può ipotizzare che PRC2 funzioni come un oloenzima e che il contributo di ogni suo componente aggiuntivo sia richiesto per la sua massima attività. A differenza della *Drosophila*, dove sequenze di DNA note come Polycomb Response Elements (PRE) rappresentano i siti specifici legati dal complesso PcG (Ringrose and Paro, 2007; Schuettengruber and Cavalli, 2009), nei mammiferi ancora non è chiaro come il complesso PRC2 venga reclutato sulla cromatina e come sia in grado di agire in maniera specifica in determinate posizioni del genoma, differenti a seconda del tipo cellulare e dei programmi trascrizionali attuati.

Nel corso degli anni, numerosi studi hanno permesso di identificare diverse regioni sul genoma in grado di richiamare il complesso PRC2. La prima sequenza PRE nell'uomo è stata identificata nel 2009 da Sing e colleghi. Questa sequenza, nominata PRE-kr, è in grado di richiamare PRC1 e PRC2, con un'affinità diversa e, sorprendentemente, gli autori hanno dimostrato che PRC1 si lega alla sequenza PRE con un'affinità maggiore di quella che PRC2 ha per la stessa sequenza e che il legame di PRC1 a PRE non dipende strettamente dalla presenza del complesso PRC2 (Sing, et al., 2009).

Ancora più recentemente (Woo, et al., 2010) è stata identificata una regione di 1.8 Kb, tra i loci HOXD11 e HOD12 (D11.12) in cellule staminali embrionali umane, contenente siti di legame per la proteina YY1 (Yin yang 1, ortologo di PHO) a sua volta in grado di reclutare PRC1 e PRC2 sulle sequenze PRE.

Ulteriori indagini hanno rilevato che le regioni target del complesso PRC2 tendono a correlare con la presenza di isole CpG (Mohn, et al., 2008). In particolare, studi recenti hanno dimostrato che le isole CpG non metilate reclutano le proteine PcG (Lynch, et al., 2012).

Tuttavia, ancora poco si conosce sulle sequenze PRE nell'uomo, pertanto, ulteriori studi saranno necessari al fine di migliorare le conoscenze sia dal punto di vista funzionale che genetico.

Da tutte queste informazioni ottenute, sia riguardo il complesso Polycomb che il gene JARID2, possiamo concludere sostanzialmente che JARID2 è coinvolto nello sviluppo del palato e, di conseguenza, nell'insorgenza delle schisi orofacciali non sindromiche (Scapoli, et al., 2010) e che interagisce con il complesso PRC2 nel regolare il pattern di espressione di geni dello sviluppo modificando lo stato della cromatina (Peng, et al., 2009; Pasini, et al., 2010).

L'azione di PRC2 risulta fondamentale nel determinare quegli articolati cambiamenti trascrizionali legati alla differenziazione cellulare e alla morfogenesi. Nello specifico, durante la formazione del labbro e del palato, processi tissutali si avvicinano, convergono e fondono tra loro grazie alla transizione epitelio-mesenchimale delle cellule che rivestono i processi in fusione (Greene and Pisano, 2005; Kang and Svoboda, 2005). E' logico supporre che l'aumento dell'espressione di JARID2 osservato nelle cellule epiteliali delle lamine palatine che si approssimano alla fusione sia riconducibile al reclutamento di PRC2 necessario per la transizione epitelio-mesenchimale.

Per continuare il progetto avviato dal gruppo di ricerca di cui faccio parte ho deciso di selezionare e studiare polimorfismi di geni che codificano per elementi o partner del complesso PRC2, utilizzando il campione di studio precedentemente impiegato per dimostrare associazione con il gene JARID2.

L'indagine ha avuto inizio nel laboratorio del gruppo di ricerca italiano ed è continuata durante il mio periodo di permanenza all'estero presso il laboratorio della Dott.ssa Mangold dell'Università di Bonn.

Nello specifico, nel laboratorio italiano ho considerato gli elementi del complesso *core* di PRC2: EZH1, EZH2, EED, SUZ12 e RBBP4; proteine implicate nel reclutamento di PcG alle sequenze PREs: BCOR e SNAIL1; alcune subunità del complesso PRC1: PHC1, CBX4 e PHF8. Una volta identificati i geni, ho selezionato i polimorfismi da utilizzare nello studio di associazione allelica, sfruttando le mappe di LD elaborate dal consorzio internazionale per il progetto Hapmap usando il software Haploview (Tabella 15).

SNP	Posizione (hg19)	Locus	Geni
rs9691534	148,544,919	7q36	EZH2
rs3757441	148,524,752	7q36	EZH2

rs1880358	148,572,504	7q36	EZH2
rs6464926	148,519,011	7q36	EZH2
rs2072407	148,508,833	7q36	EZH2
rs7790642	148,600,310	7q36	EZH2
rs10898457	85,967,064	11q14	EED
rs10792845	85,986,518	11q14	EED
rs17210343	85,987,818	11q14	EED
rs2934766	33,119,593	1p35	RBBP4
rs16835131	33,148,935	1p35	RBBP4
rs4393046	39,914,187	Xp11	BCOR
rs5963154	39,918,362	Xp11	BCOR
rs6520623	40,042,533	Xp11	BCOR
rs5963755	40,064,033	Xp11	BCOR
rs10126799	40,076,904	Xp11	BCOR
rs12556250	40,064,494	Xp11	BCOR
rs501773	30,314,435	17q11	SUZ12
rs6091080	48,603,887	20q13	SNAI1
rs16995010	48,602,623	20q13	SNAI1
rs7883019	53,969,347	Xp11	PHF8
rs5960612	53,969,347	Xp11	PHF8
rs3026261	9,090,668	12p13	PHC1
rs3809218	9,066,613	12p13	PHC1
rs1805740	9,066,613	12p13	PHC1
rs887783	9,085,099	12p13	PHC1
rs1805775	9,084,534	12p13	PHC1
rs3764374	77,815,296	17q25	CBX4
rs2289728	77,811,854	17q25	CBX4
rs1285250	77,809,998	17q25	CBX4

**Tabella 15.** Elenco dei geni e dei polimorfismi appartenenti a ed interagenti con il complesso Polycomb.

Nel laboratorio di ricerca tedesco ho continuato la selezione dei geni appartenenti a ed interagenti con il complesso (Tabella 16).

SNP	Posizione (hg19)	Locus	Geni
rs11812076	33,082,731	1p35	ZBTB8OS

rs115646939	33,712,123	1p35	ZNF362
rs191496347	169,917,196	3q26	PHC3
rs62296764	714,092	4p16	PCGF3
rs1113121	4,920,085	6p25	CDYL
rs1676910	148,652,565	7q36	EZH2
rs76978994	123,533,969	9q33	FBXW2
rs10785991	92,921,798	10q23	PCGF5
rs10792839	85,938,133	11q14	EED
rs34678884	19,508,454	12p12	PLEKHA5
rs189510239	54,329,025	12q13	HOXC-AS5
rs45448092	54,449,659	12q13	HOXC4
rs79081584	101,283,063	14q32	MEG3
rs2277618	40,822,678	17q21	PLEKHH3
rs2289728	77,811,854	17q25	CBX4
rs16964886	31,321,994	18q12	ASXL3
rs78397383	39,169,721	22q13	SUN2
rs6519156	39,319,986	22q13	APOBEC3A
rs17000762	39,516,243	22q13	COX5BP7
rs117072685	41,518,460	22q13	EP300

**Tabella 16.** Elenco dei geni e dei polimorfismi appartenenti a ed interagenti con il complesso Polycomb.

Dopo un'adeguata meta-analisi, le varianti geniche selezionate sono state genotipizzate, in entrambi i laboratori, mediante tecnologia Sequenom MassARRAY®.

L'analisi di associazione genotipica, condotta mediante l'impiego del software Unphased v3.1.7, è stata realizzata unendo i risultati emersi da entrambe le indagini (Tabella17):

Informazioni SNP					Associazione P-values		Rischio Relativo (95% CI)	
SNP ID	Locus	Geni	Posizione (hg19)	Alleli	Chids	P value	RR_Het	RR_Hom
rs11812076	1p35	RBBP4	33,082,731	C/T	5,83	0,01	.	.
rs2934766	1p35	RBBP4	33,119,593	A/G	1,25	0,26	.	.
rs16835131	1p35	RBBP4	33,148,935	A/G	0,03	0,86	0,57 (0,20-1,65)	0,59 (0,20-1,17)
rs115646939	1p35	ZNF362	33,712,123	G/T	4,09	0,04	.	.
rs191496347	3q26	PHC3	169,917,196	A/C	1	0,32	.	.
rs62296764	4p16	PCGF3	714,092	A/T	.	.	.	.
rs1113121	6p25	CDYL	4,920,085	A/T	1,75	0,18	1,31 (0,73-2,34)	1,52 (0,81-2,83)



rs7790642	7q36	EZH2	148,600,310	C/T	0,4	0,53	0,95 (0,64-1,40)	0,87 (0,54-1,37)
rs1880358	7q36	EZH2	148,572,504	C/T	0,77	0,38	0,88 (0,54-1,45)	1,06 (0,62-1,80)
rs9691534	7q36	EZH2	148,544,919	C/T	2,57	0,11	0,71 (0,36-1,41)	0,99 (0,49-2,02)
rs3757441	7q36	EZH2	148,524,752	C/T	0,17	0,68	1,39 (0,25-7,66)	1,55 (0,23-10,18)
rs6464926	7q36	EZH2	148,519,011	C/T	2,61	0,10	0,92 (0,66-1,28)	0,70 (0,46-1,08)
rs1676910	7q36	EZH2	148,652,565	A/C	0,86	0,35	0,67 (0,15-2,87)	0,57 (0,13-2,53)
rs2072407	7q36	EZH2	148,508,833	C/T	2,90	0,09	1,20 (0,76-1,91)	1,46 (0,88-2,43)
rs76978994	9q33	FBXW2	123,533,969	C/G	0	1	0,31 (0,02-5,13)	0,37 (0,02-6,43)
rs10785991	10q23	PCGF5	92,921,798	C/G	0,78	0,37	1,43 (0,39-5,29)	1,64 (0,43- 6,20)
rs10898457	11q14	EED	85,967,064	A/G	3,17	0,07	0,88 (0,60-1,20)	0,68 (0,42-1,10)
rs10792845	11q14	EED	85,986,518	A/G	2,70	0,10	1,21 (0,53-2,79)	1,59 (0,65-3,60)
<b>rs17210343</b>	11q14	EED	85,987,818	A/C	5,23	<b>0,02</b>	.	.
<b>rs10792839</b>	11q14	EED	85,938,133	A/C	7,49	<b>0,006</b>	1,51 (0,67-3,39)	2,22 (0,96-5,10)
rs34678884	12p12	PLEKHA5	19,508,454	C/T	1,05	0,30	0,47 (0,16-1,39)	0,65 (0,21-1,99)
rs3809218	12p13	PHC1	9,066,613	A/G	2,93	0,09	1,10 (0,73-1,66)	0,77 (0,48-1,24)
rs1805740	12q13	PHC1	9,075,014	A/C	1,07	0,30	1,07 (0,62-1,84)	0,88 (0,49-1,58)
rs1805775	12q13	PHC1	9,084,534	A/G	1,89	0,17	0,98 (0,39-2,49)	1,29 (0,49-3,34)
<b>rs887783</b>	12q13	PHC1	9,085,099	A/G	4,84	<b>0,03</b>	0,46 (0,14-1,57)	0,14 (0,02-0,88)
rs3026261	12q13	PHC1	9,090,668	A/G	1,87	0,17	1,10 (0,56-2,17)	0,84 (0,41-1,73)
rs189510239	12q13	HOXC-AS5	54,329,025	A/G	.	.	.	.
rs45448092	12q13	HOXC4	54,449,659	C/T	0,58	0,44	0,56 (0,25-1,26)	0,54 (0,23-1,27)
rs79081584	14q32	MEG3	101,283,063	C/T	0,09	0,76	.	.
rs501773	17q11	SUZ12	30,314,435	G/T	0,63	0,43	1,21 (0,58-2,62)	1,03 (0,46-2,30)
rs2277618	17q21	PLEKHH3	40,822,678	C/T	0,81	0,36	2,10 (0,61-7,23)	2,26 (0,64-7,92)
rs3764374	17q25	CBX4	77,815,296	A/G	0,01	0,91	0,10 (0,01-1,00)	0,12 (0,01-1,22)
rs2289728	17q25	CBX4	77,811,854	C/T	0,45	0,50	1,39 (0,67-2,87)	1,44 (0,68-3,06)
rs1285250	17q25	CBX4	77,809,998	C/T	1,19	0,27	0,71 (0,51-1,01)	0,76 (0,50-1,14)
rs2289728	17q25	CBX4	77,811,854	C/T	0,47	0,49	1,43 (0,67-3,06)	1,49 (0,68-3,27)
rs16964886	18q12	ASXL3	31,321,994	C/T	0,09	0,76	0,91 (0,50-1,65)	1,10 (0,61-1,98)
rs16995010	20q13	SNAI1	48,602,623	C/G	2,75	0,09	1,03 (0,43-2,45)	1,37 (0,56-3,37)
rs6091080	20q13	SNAI1	48,603,887	C/G	3,21	0,07	0,85 (0,47-1,54)	1,20 (0,64-2,24)
rs117072685	22q13	EP300	41,518,460	A/G	.	.	.	.
rs17000762	22q13	COX5BP7	39,516,243	A/G	1	0,31	.	.
rs78397383	22q13	SUN2	39,169,721	A/C	4,26	0,03	1 (0,43-2,27)	1,46 (0,63-5,41)
rs6519156	22q13	APOBEC3A	39,319,986	C/T	0,57	0,45	.	.
rs10126799	Xp11	BCOR	40,076,904	A/G	0,46	0,50	0,58 (2,29-1,17)	0,91 (0,63-1,31)

rs5963755	Xp11	BCOR	40,064,033	A/G	0,06	0,80	1,09 (0,76-1,58)	0,64 (0,33-1,28)
rs6520623	Xp11	BCOR	40,042,533	A/C	0,76	0,38	1,75 (0,73-4,21)	1,06 (0,61-1,81)
rs5963154	Xp11	BCOR	39,918,362	A/C	3,16	0,07	1,03 (0,59-1,79)	1,23 (0,88-1,72)
rs7883019	Xp11	BCOR	53,969,347	A/G	2,06	0,15	0,50 (0,19-1,36)	0,63 (0,36-1,11)

**Tabella 17.** Risultati di associazione dei polimorfismi appartenenti a ed interagenti con il complesso PRC2.

Per ogni SNP indagato, le frequenze genotipiche delle triadi analizzate sono risultate essere in accordo con l'equilibrio di Hardy-Weinberg e non sono stati evidenziati errori mendeliani.

Il test di associazione genotipica ha evidenziato una significativa associazione per i marcatori rs10792839 ( $P = 0,006$ ) e rs17210343 ( $P = 0,02$ ) del gene EED ed rs887783 ( $P = 0,03$ ) del gene PHC1. Per altri 8 polimorfismi: rs11812076 del gene RBB4, rs2072407 del gene EZH2, rs10898457 del gene EED, rs3809218 del gene PHC1, rs16995010 e rs6091080 del gene SNAI1, rs5963154 del gene BCOR e rs78397383 del gene SUN2, è stato evidenziato un trend di significatività.

Per tutti gli altri SNPs genotipizzati, non è stata dimostrata associazione significativa con la malattia, nell'ambito del campione di studio considerato.

Per approfondire l'associazione evidenziata per due dei polimorfismi indagati sul gene EED al *locus* 11q14, ho eseguito l'analisi degli aplotipi per tutti i marcatori considerati rappresentativi del gene, sottolineando, anche in questo caso, l'associazione con la malattia. Nello specifico, in tabella 18 sono riportati tutti gli aplotipi per i marcatori considerati e in grassetto sono evidenziati gli aplotipi che hanno fornito associazione significativa.

Aplotipo				T	NT	T-Freq	NT-Freq	Chisq	P value
M1	M2	M3	M4						
A	A	-	-	301	317	0,44	0,46	0,74	0,39
A	G	-	-	123	140	0,18	0,20	1,42	0,23
G	A	-	-	266	233	0,39	0,34	3,64	0,06
A	-	A	-	408	428	0,60	0,63	1,33	0,25
A	-	C	-	12	26	0,02	0,04	5,16	0,02
G	-	A	-	262	228	0,38	0,33	3,96	0,05
A	-	-	A	251	260	0,43	0,44	0,30	0,59
A	-	-	C	105	135	0,18	0,23	4,95	0,03
G	-	-	A	232	193	0,40	0,33	5,87	0,02

-	A	A	-	578	541	0,81	0,75	5,73	0,02
-	A	C	-	14	29	0,02	0,04	5,23	0,02
-	G	A	-	126	148	0,18	0,21	2,28	0,13
-	A	-	A	479	444	0,82	0,76	6,77	0,009
-	A	-	C	14	34	0,02	0,06	8,70	<b>0,003</b>
-	G	-	C	91	106	0,16	0,18	1,43	0,23
-	-	A	A	507	467	0,82	0,76	8,16	0,004
-	-	A	C	104	129	0,17	0,20	3,42	0,06
-	-	C	C	7	22	0,01	0,06	7,76	0,005
A	A	A	-	282	285	0,42	0,42	0,03	0,87
A	A	C	-	11	26	0,02	0,04	6,09	0,01
A	G	A	-	122	138	0,18	0,20	1,28	0,26
G	A	A	-	261	227	0,39	0,34	3,99	0,05
A	A	-	A	230	229	0,42	0,42	0,003	0,95
A	A	-	C	10	27	0,02	0,50	7,81	0,005
A	G	-	C	87	99	0,16	0,18	0,97	0,32
G	A	-	A	219	191	0,40	0,35	3,19	0,07
A	-	A	A	245	249	0,43	0,43	0,06	0,14
A	-	A	C	98	117	0,17	0,20	2,16	0,14
A	-	C	C	5	18	0,01	0,03	7,35	0,01
G	-	A	A	226	190	0,39	0,33	5,18	0,02
-	A	A	A	468	432	0,82	0,76	7,20	0,007
-	A	A	C	7	14	0,01	0,02	2,33	0,12
-	A	C	C	7	20	0,01	0,03	6,26	0,01
-	G	A	C	90	106	0,16	0,19	1,64	0,20
A	A	A	A	216	213	0,43	0,42	0,03	0,84
A	A	C	C	4	16	0,01	0,03	7,20	0,007
A	G	A	C	81	95	0,16	0,18	1,42	0,23
G	A	A	A	201	178	0,40	0,35	2,42	0,12

**Tabella 18.** Analisi di associazione degli aplotipi al locus 11q14.

M1 = rs10898457, M2 = rs10792845, M3 = rs17210343 ed M4 = rs10792839.

In particolare, l'aplotipo rs10792845 (A) – rs10792839 (C) ha riportato il grado di associazione più significativo ( $P = 0,003$ ). Inoltre, l'analisi dell'Odd Ratio (non riportata nel grafico) dell'aplotipo (OR=0.38; C.I. 95% 0.20-0.72) ci consente di ipotizzare che la

sottotrasmissione dell'aplotipo ai probandi potrebbe indicare un possibile ruolo protettivo dalla malattia.

Ho eseguito la stessa analisi per il locus 12q13 ed in Tabella 19 ho riportato gli aplotipi per tutti i marcatori considerati.

Aplotipo			T	NT	T-Freq	NT-Freq	Chisq	P value
M1	M2	M3						
A	A	-	16	9	0,28	0,16	2,13	0,14
A	G	-	13	9	0,22	0,16	1,00	0,32
G	G	-	29	40	0,50	0,69	4,84	0,03
A	A	A	10	4	0,26	0,11	2,57	0,11
A	G	A	9	5	0,24	0,13	1,60	0,21
G	G	A	19	29	0,50	0,76	5,56	0,02

**Tabella 19.** Analisi di associazione degli aplotipi al locus 12q13.

M1 = rs887783, M2 = rs3026261, M3 = rs189510239.

Dalla tabella è possibile rilevare come l'aplotipo rs887783 (G) – rs3026261 (G) – rs189510239 (A) presenti il grado di associazione più significativo ( $P = 0,02$ ).

Questi risultati ci permettono di ipotizzare un possibile ruolo delle mutazioni a carico del gene EED e PHC1 nell'insorgenza della NSCL/P. Per confermare questa ipotesi sarà necessario condurre ulteriori analisi, possibilmente con campioni di studio ampi e di etnie diverse.

## *5. SOMMARIO*

La NSCL/P è una frequente malformazioni congenita con un'incidenza mondiale di circa 1/700 nati vivi, che occupa un posto di primaria importanza nel campo della ricerca in quanto compromette la morfologia e la funzionalità del volto con gravi difficoltà nell'alimentazione, difetti a livello fonetico e conseguenti problemi sia estetici che psicologici.

È una patologia ad eziologia complessa, attualmente il modello più accreditato è quello multifattoriale che vede l'interazione di fattori genetici e ambientali. Pertanto, l'identificazione dei fattori di rischio è di rilevante importanza ed è fondamentale per implementare la diagnosi e la prevenzione di questa frequente malformazione congenita.

L'obiettivo del mio progetto è stato focalizzato sulla componente genetica della NSCL/P, mirato ad identificare *loci* e geni che concorrono nel determinare il fenotipo malattia.

I fattori ambientali come l'alimentazione e l'apporto vitaminico risultano giocare un ruolo privilegiato nell'insorgenza della malformazione. Negli ultimi anni, gli studi incentrati sulla catena dell'acido folico hanno permesso di mettere in risalto il ruolo chiave di questa via metabolica nello sviluppo orofacciale. Pertanto, alterazioni a carico dei geni che codificano per enzimi, recettori o carrier che intervengono in questa cascata metabolica possono essere considerati possibili fattori di suscettibilità per la NSCL/P.

Nella prima parte del mio progetto di Dottorato ho analizzato, su un campione di studio rappresentativo della popolazione Italiana, il ruolo nella NSCL/P di due geni che, in modo diverso, agiscono nell'ambito della via metabolica del folato: il gene RFC1 ed il gene DHFR.

Il gene RFC1 è un carrier del folato ridotto, essenziale per il mantenimento della concentrazione di folato intracellulare per il quale è stata evidenziata una debole associazione tra i polimorfismi indagati e la NSCL/P, confermando così i dati già presenti in letteratura secondo cui RFC1 può essere considerato un fattore di suscettibilità nell'insorgenza delle NSCL/P (Jezewski, et al., 2003; Suzuki, et al., 2004; Vieira, 2008).

Il gene DHFR codifica per un enzima in grado di convertire il diidrofolato in tetraidrofolato, un veicolatore del gruppo metile, necessario per la sintesi *de novo* di purine, acido timidilico ed alcuni aminoacidi. I dati ottenuti da questo studio evidenziano un'associazione con significatività borderline tra lo SNP rs1677693 e la malattia. Ad oggi, tali risultati rappresentano il primo tentativo di ricondurre ed attribuire un ruolo all'enzima diidrofolato reductasi nelle NSCL/P. Per rafforzare questa ipotesi di associazione tra il gene d'interesse e la patologia, sono sicuramente necessari ulteriori studi di replicazione.

Durante il mio periodo formativo all'estero presso il laboratorio della Dott.ssa Elisabeth Mangold (Institute of Human Genetics) dell'Università di Bonn, ho avuto l'opportunità di analizzare, sul mio campione di studio rappresentativo della popolazione Italiana,

l'associazione tra la malattia e 15 regioni cromosomiche, già identificate dallo stesso gruppo di ricerca, mediante GWAS, su altre coorti di studio ( Rahimov, et al., 2008; Birnbaum, et al., 2009; Moreno, et al., 2009; Beaty, et al., 2010; Mangold, et al., 2010; Beaty, et al., 2013; Aldhorae, et al., 2014; Ludwig, et al., 2012).

L'analisi ha mostrato associazione significativa per i marcatori al *locus* 8q24 ed al *locus* 1p22, sottolineando l'importanza di questi *loci* nel determinare la suscettibilità alla malattia. Per altri 4 *loci* (1q32, 3q12, 8q21 e 10q25) è stata mostrata una significatività nominale di associazione e per il *locus* 1p36 è stato invece evidenziato un trend di significatività.

I dati ottenuti migliorano le conoscenze sulla malformazione ma, anche in questo caso, ulteriori studi necessari sono auspicabili, allo scopo di confermare l'associazione tra le varianti genetiche di questi *loci* e la NSCL/P anche in altri gruppi etnici.

Così come riportato nel titolo della mia tesi di Dottorato l'obiettivo principale del mio lavoro di tesi è stato quello di valutare il ruolo del complesso Polycomb nel determinare la NSCL/P.

Nell'uomo esistono due complessi Polycomb: il complesso PRC1 e PRC2, entrambi costituiti da un set di geni codificanti per una famiglia di proteine che insieme formano complessi multiproteici in grado di rimodellare la cromatina, agendo da repressori trascrizionali a carico di migliaia di geni e decine di pathways coinvolti nello sviluppo e nella differenziazione cellulare.

Il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto la mia attività di Dottorato ha evidenziato che, durante i processi di fusione a livello delle cellule epiteliali delle lamine palatine, è altamente e specificamente espresso il gene JARID2 (Scapoli, et al., 2010). Contemporaneamente, altri studi hanno evidenziato che JARID2 interagisce con il complesso PRC2 nel regolare il pattern di espressione di geni dello sviluppo modificando lo stato della cromatina (Peng, et al., 2009; Pasini, et al., 2010). Nel complesso JARID2/PRC2, JARID2 promuove il legame di PRC2 con il DNA e ne regola negativamente l'attività metilasica.

E' logico supporre che l'aumento dell'espressione di JARID2 osservato nelle cellule epiteliali delle lamine palatine che si approssimano alla fusione, richiami il complesso PRC2 che, reprimendo la trascrizione genica, favorisce la transizione epitelio-mesenchimale (EMT).

Da quanto detto, è facile presumere che mutazioni a carico dei geni appartenenti a ed interagenti con questo importante complesso multiproteico possano essere considerati potenziali fattori di rischio genetico nel determinare la NSCL/P.

Partendo da questa base razionale, ho deciso di selezionare e studiare polimorfismi di geni che codificano per elementi o partner del complesso PRC2 e PRC1, utilizzando il campione di studio precedentemente impiegato per dimostrare associazione con il gene JARID2.

Ho avviato quest'indagine nel laboratorio del gruppo di ricerca di cui faccio parte ed ho continuato la stessa durante il mio periodo di permanenza all'estero presso il laboratorio della Dott.ssa Mangold dell'Università di Bonn.

In entrambe le indagini, limitatamente al campione di studio da me impiegato, ho evidenziato associazione significativa per alcuni dei polimorfismi dei geni indagati e la patologia, associazione poi confermata dall'analisi degli aplotipi.

Le analisi condotte nel corso di questo triennio sui geni candidati che potrebbe contribuire allo sviluppo della NSCL/P mi hanno permesso di raccogliere risultati interessanti riguardanti l'eziologia della malformazione, migliorando così le conoscenze nell'ambito della patologia; saranno comunque necessari ulteriori studi di replicazione per confermare l'associazione tra le varianti genetiche di tutti questi *loci* e la NSCL/P, anche in altre popolazioni.



## *6. BIBLIOGRAFIA*

- Aldhorae KA, Bohmer AC, Ludwig KU, Esmail AH, Al-Hebshi NN, Lippke B, Golz L, Nothen MM, Daratsianos N, Knapp M and others. 2014. Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in arab populations: genetic analysis of 15 risk loci in a novel case-control sample recruited in Yemen. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 100:307-313.
- Alkuraya FS, Saadi I, Lund JJ, Turbe-Doan A, Morton CC, Maas RL. 2006. SUMO1 haploinsufficiency leads to cleft lip and palate. *Science* 313:1751.
- Ardinger HH, Buetow KH, Bell GI, Bardach J, VanDemark DR, Murray JC. 1989. Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 45:348-353.
- Avila JR, Jezewski PA, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Christensen K, Daack-Hirsch S, Romitti PA, Murray JC. 2006. PVRL1 variants contribute to non-syndromic cleft lip and palate in multiple populations. *Am J Med Genet A* 140:2562-2570.
- Badovinac RL, Werler MM, Williams PL, Kelsey KT, Hayes C. 2007. Folic acid-containing supplement consumption during pregnancy and risk for oral clefts: a meta-analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 79:8-15.
- Bailey CM, Abbott DE, Margaryan NV, Khalkhali-Ellis Z, Hendrix MJ. 2008. Interferon regulatory factor 6 promotes cell cycle arrest and is regulated by the proteasome in a cell cycle-dependent manner. *Mol Cell Biol* 28:2235-2243.
- Bailey LJ, Johnston MC, Billet J. 1995. Effects of carbon monoxide and hypoxia on cleft lip in A/J mice. *Cleft Palate Craniofac J* 32:14-19.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263-265.
- Beaty TH, Hetmanski JB, Zeiger JS, Fan YT, Liang KY, VanderKolk CA, McIntosh I. 2002. Testing candidate genes for non-syndromic oral clefts using a case-parent trio design. *Genet Epidemiol* 22:1-11.
- Beaty TH, Murray JC, Marazita ML, Munger RG, Ruczinski I, Hetmanski JB, Liang KY, Wu T, Murray T, Fallin MD and others. 2010. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet* 42:525-529.
- Beaty TH, Taub MA, Scott AF, Murray JC, Marazita ML, Schwender H, Parker MM, Hetmanski JB, Balakrishnan P, Mansilla MA and others. 2013. Confirming genes influencing risk to cleft lip with/without cleft palate in a case-parent trio study. *Hum Genet* 132:771-781.
- Beaudin AE, Stover PJ. 2009. Insights into metabolic mechanisms underlying folate-responsive neural tube defects: a minireview. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 85:274-284.
- Becker T, Knapp M. 2004. A powerful strategy to account for multiple testing in the context of haplotype analysis. *Am J Hum Genet* 75:561-570.
- Bender PL. 2000. Genetics of cleft lip and palate. *J Pediatr Nurs* 15:242-249.
- Biggs LC, Rhea L, Schutte BC, Dunnwald M. 2012. Interferon regulatory factor 6 is necessary, but not sufficient, for keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* 132:50-58.
- Bille C, Olsen J, Vach W, Knudsen VK, Olsen SF, Rasmussen K, Murray JC, Andersen AM, Christensen K. 2007. Oral clefts and life style factors--a case-cohort study based on prospective Danish data. *Eur J Epidemiol* 22:173-181.
- Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, Steffens M, Rubini M, Baluado C, Ferrian M, Almeida de Assis N, Alblas MA and others. 2009. Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet* 41:473-477.
- Blanton SH, Burt A, Stal S, Mulliken JB, Garcia E, Hecht JT. 2010. Family-based study shows heterogeneity of a susceptibility locus on chromosome 8q24 for nonsyndromic cleft lip and palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88:256-259.
- Bohmer AC, Mangold E, Tessmann P, Mossey PA, Steegers-Theunissen RP, Lindemans J, Bouwman-Both M, Rubini M, Franceschelli P, Aiello V and others. 2013. Analysis of susceptibility loci for nonsyndromic orofacial clefting in a European trio sample. *Am J Med Genet A* 161A:2545-2549.
- Boyles AL, DeRoo LA, Lie RT, Taylor JA, Jugessur A, Murray JC, Wilcox AJ. 2010. Maternal alcohol consumption, alcohol metabolism genes, and the risk of oral clefts: a population-based case-control study in Norway, 1996-2001. *Am J Epidemiol* 172:924-931.

- Boyles AL, Wilcox AJ, Taylor JA, Meyer K, Fredriksen A, Ueland PM, Drevon CA, Vollset SE, Lie RT. 2008. Folate and one-carbon metabolism gene polymorphisms and their associations with oral facial clefts. *Am J Med Genet A* 146A:440-449.
- Brito LA, Paranaíba LM, Bassi CF, Masotti C, Malcher C, Schlesinger D, Rocha KM, Cruz LA, Barbara LK, Alonso N and others. 2012. Region 8q24 is a susceptibility locus for nonsyndromic oral clefting in Brazil. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 94:464-468.
- Butali A, Little J, Chevrier C, Cordier S, Steegers-Theunissen R, Jugessur A, Oladugba B, Mossey PA. 2013. Folic acid supplementation use and the MTHFR C677T polymorphism in orofacial clefts etiology: An individual participant data pooled-analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 97:509-514.
- Cao R, Zhang Y. 2004. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell* 15:57-67.
- Carinci F, Pezzetti F, Scapoli L, Padula E, Baciliero U, Curioni C, Tognon M. 1995. Nonsyndromic cleft lip and palate: evidence of linkage to a microsatellite marker on 6p23. *Am J Hum Genet* 56:337-339.
- Carmichael SL, Shaw GM, Ma C, Werler MM, Rasmussen SA, Lammer EJ. 2007. Maternal corticosteroid use and orofacial clefts. *Am J Obstet Gynecol* 197:585 e581-587; discussion 683-584, e581-587.
- Celli J, Duijf P, Hamel BC, Bamshad M, Kramer B, Smits AP, Newbury-Ecob R, Hennekam RC, Van Buggenhout G, van Haeringen A and others. 1999. Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell* 99:143-153.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Smoking during pregnancy--United States, 1990-2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2004 53:911-915.
- Chenevix-Trench G, Jones K, Green AC, Duffy DL, Martin NG. 1992. Cleft lip with or without cleft palate: associations with transforming growth factor alpha and retinoic acid receptor loci. *Am J Hum Genet* 51:1377-1385.
- Cobourne MT. 2004. The complex genetics of cleft lip and palate. *Eur J Orthod* 26:7-16.
- Conway H. 1958. Effect of supplemental vitamin therapy on the limitation of incidence of cleft lip and cleft palate in humans. *Plast Reconstr Surg Transplant Bull* 22:450-453.
- Crider KS, Yang TP, Berry RJ, Bailey LB. 2012. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. *Adv Nutr* 3:21-38.
- Czeizel AE. 1993. Prevention of congenital abnormalities by periconceptional multivitamin supplementation. *Bmj* 306:1645-1648.
- Damm K, Heyman RA, Umesono K, Evans RM. 1993. Functional inhibition of retinoic acid response by dominant negative retinoic acid receptor mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2989-2993.
- Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. 2011. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet* 12:167-178.
- Dudbridge F. 2008. Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. *Hum Hered* 66:87-98.
- Edwards MJ, Agho K, Attia J, Diaz P, Hayes T, Illingworth A, Roddick LG. 2003. Case-control study of cleft lip or palate after maternal use of topical corticosteroids during pregnancy. *Am J Med Genet A* 120A:459-463.
- Eiberg H, Bixler D, Nielsen LS, Conneally PM, Mohr J. 1987. Suggestion of linkage of a major locus for nonsyndromic orofacial cleft with F13A and tentative assignment to chromosome 6. *Clin Genet* 32:129-132.
- Ericson A, Kallen BA. 2001. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in early pregnancy. *Reprod Toxicol* 15:371-375.
- Ethen MK, Ramadhani TA, Scheuerle AE, Canfield MA, Wyszynski DF, Druschel CM, Romitti PA. 2009. Alcohol consumption by women before and during pregnancy. *Matern Child Health J* 13:274-285.
- Feldman GL, Weaver DD, Lovrien EW. 1977. The fetal trimethadione syndrome: report of an additional family and further delineation of this syndrome. *Am J Dis Child* 131:1389-1392.
- Fogh-Andersen P. 1942. Inheritance of harelip and cleft palate. Copenhagen: Busck.
- Fontoura C, Silva RM, Granjeiro JM, Letra A. 2012. Further evidence of association of the ABCA4 gene with cleft lip/palate. *Eur J Oral Sci* 120:553-557.

- Garrow JS. 1989. Recent developments in clinical nutrition. A review. *J R Coll Physicians Lond* 23:15-18.
- Grant SF, Wang K, Zhang H, Glaberson W, Annaiah K, Kim CE, Bradfield JP, Glessner JT, Thomas KA, Garriss M and others. 2009. A genome-wide association study identifies a locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 8q24. *J Pediatr* 155:909-913.
- Greene RM, Pisano MM. 2005. Recent advances in understanding transforming growth factor beta regulation of orofacial development. *Hum Exp Toxicol* 24:1-12.
- Gropper, Smith, Groff. 2009. Advanced nutrition and human metabolism.
- Haff LA, Smirnov IP. 1997. Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry. *Genome Res* 7:378-388.
- Hernandez-Diaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. 2000. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med* 343:1608-1614.
- Herz HM, Shilatfard A. 2010. The JARID2-PRC2 duality. *Genes Dev* 24:857-861.
- Holder SE, Vintiner GM, Farren B, Malcolm S, Winter RM. 1992. Confirmation of an association between RFLPs at the transforming growth factor-alpha locus and non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet* 29:390-392.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7276-7280.
- Holmes LB, Baldwin EJ, Smith CR, Habecker E, Glassman L, Wong SL, Wyszynski DF. 2008. Increased frequency of isolated cleft palate in infants exposed to lamotrigine during pregnancy. *Neurology* 70:2152-2158.
- Honein MA, Rasmussen SA, Reefhuis J, Romitti PA, Lammer EJ, Sun L, Correa A. 2007. Maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure and the risk of orofacial clefts. *Epidemiology* 18:226-233.
- Horvath S, Xu X, Laird NM. 2001. The family based association test method: strategies for studying general genotype--phenotype associations. *Eur J Hum Genet* 9:301-306.
- Hunkapiller J, Shen Y, Diaz A, Cagney G, McCleary D, Ramalho-Santos M, Krogan N, Ren B, Song JS, Reiter JF. 2012. Polycomb-like 3 promotes polycomb repressive complex 2 binding to CpG islands and embryonic stem cell self-renewal. *PLoS Genet* 8:e1002576.
- Ianakev P, Kilpatrick MW, Toudjarska I, Basel D, Beighton P, Tsipouras P. 2000. Split-hand/split-foot malformation is caused by mutations in the p63 gene on 3q27. *Am J Hum Genet* 67:59-66.
- Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PW, Rosenberg IH. 1999. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med* 340:1449-1454.
- James SJ, Melnyk S, Jernigan S, Pavliv O, Trusty T, Lehman S, Seidel L, Gaylor DW, Cleves MA. 2010. A functional polymorphism in the reduced folate carrier gene and DNA hypomethylation in mothers of children with autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B:1209-1220.
- Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien SE, Daack-Hirsch S, Schultz RE, Weber A, Nepomucena B and others. 2003. Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet* 40:399-407.
- Jia, Li, Li, Wu, Zhu, Yang, Chen, Shi. 2009. Association among IRF6 polymorphism, environmental factors, and nonsyndromic orofacial clefts in western china. *DNA Cell Biol*.
- Johnson, Little. 2008. Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? *Int J Epidemiol*.
- Jugessur A, Farlie PG, Kilpatrick N. 2009. The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Dis* 15:437-453.
- Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Murray JC, Taylor JA, Saugstad OD, Vindenes HA, Abyholm F. 2003a. Variants of developmental genes (TGFA, TGFB3, and MSX1) and their associations with orofacial clefts: a case-parent triad analysis. *Genet Epidemiol* 24:230-239.
- Jugessur A, Wilcox AJ, Lie RT, Murray JC, Taylor JA, Ulvik A, Drevon CA, Vindenes HA, Abyholm FE. 2003b. Exploring the effects of methylenetetrahydrofolate reductase gene variants C677T

- and A1298C on the risk of orofacial clefts in 261 Norwegian case-parent triads. *Am J Epidemiol* 157:1083-1091.
- Jung J, Mysliwiec MR, Lee Y. 2005. Roles of JUMONJI in mouse embryonic development. *Dev Dyn* 232:21-32.
- Kang P, Svoboda KK. 2005. Epithelial-mesenchymal transformation during craniofacial development. *J Dent Res* 84:678-690.
- Kanno K, Suzuki Y, Yang X, Yamada A, Aoki Y, Kure S, Matsubara Y. 2002. Lack of evidence for a significant association between nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate and the retinoic acid receptor alpha gene in the Japanese population. *J Hum Genet* 47:269-274.
- Kim H, Kang K, Kim J. 2009. AEBP2 as a potential targeting protein for Polycomb Repression Complex PRC2. *Nucleic Acids Res* 37:2940-2950.
- Kondo S, Schutte BC, Richardson RJ, Bjork BC, Knight AS, Watanabe Y, Howard E, de Lima RL, Daack-Hirsch S, Sander A and others. 2002. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet* 32:285-289.
- Kozer E, Costei AM, Boskovic R, Nulman I, Nikfar S, Koren G. 2003. Effects of aspirin consumption during pregnancy on pregnancy outcomes: meta-analysis. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 68:70-84.
- Krapels IP, van Rooij IA, Ocke MC, van Cleef BA, Kuijpers-Jagtman AM, Steegers-Theunissen RP. 2004. Maternal dietary B vitamin intake, other than folate, and the association with orofacial cleft in the offspring. *Eur J Nutr* 43:7-14.
- Kuzmichev A, Nishioka K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. 2002. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev* 16:2893-2905.
- Laegreid L, Olegard R, Conradi N, Hagberg G, Wahlstrom J, Abrahamsson L. 1990. Congenital malformations and maternal consumption of benzodiazepines: a case-control study. *Dev Med Child Neurol* 32:432-441.
- Landeira D, Sauer S, Poot R, Dvorkina M, Mazzarella L, Jorgensen HF, Pereira CF, Leleu M, Piccolo FM, Spivakov M and others. 2010. Jarid2 is a PRC2 component in embryonic stem cells required for multi-lineage differentiation and recruitment of PRC1 and RNA Polymerase II to developmental regulators. *Nat Cell Biol* 12:618-624.
- Lavery HG, Wakefield LM, Occleston NL, O'Kane S, Ferguson MW. 2009. TGF-beta3 and cancer: a review. *Cytokine Growth Factor Rev* 20:305-317.
- Leclerc D, Rozen R. 2007. [Molecular genetics of MTHFR: polymorphisms are not all benign]. *Med Sci (Paris)* 23:297-302.
- Lennon CJ, Birkeland AC, Nunez JA, Su GH, Lanzano P, Guzman E, Celis K, Eisig SB, Hoffman D, Rendon MT and others. 2012. Association of candidate genes with nonsyndromic clefts in Honduran and Colombian populations. *Laryngoscope* 122:2082-2087.
- Leoyklang P, Siriwan P, Shotelersuk V. 2006. A mutation of the p63 gene in non-syndromic cleft lip. *J Med Genet* 43:e28.
- Leslie EJ, Mansilla MA, Biggs LC, Schuette K, Bullard S, Cooper M, Dunnwald M, Lidral AC, Marazita ML, Beaty TH and others. 2012. Expression and mutation analyses implicate ARHGAP29 as the etiologic gene for the cleft lip with or without cleft palate locus identified by genome-wide association on chromosome 1p22. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 94:934-942.
- Letra A, Maili L, Mulliken JB, Buchanan E, Blanton SH, Hecht JT. 2014. Further evidence suggesting a role for variation in ARHGAP29 variants in nonsyndromic cleft lip/palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 100:679-685.
- Levine SS, Weiss A, Erdjument-Bromage H, Shao Z, Tempst P, Kingston RE. 2002. The core of the polycomb repressive complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans. *Mol Cell Biol* 22:6070-6078.
- Levy D, Jiang M, Szklo A, de Almeida LM, Autran M, Bloch M. 2013. Smoking and adverse maternal and child health outcomes in Brazil. *Nicotine Tob Res* 15:1797-1804.
- Li G, Margueron R, Ku M, Chambon P, Bernstein BE, Reinberg D. 2010. Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression. *Genes Dev* 24:368-380.
- Lidral AC, Moreno LM. 2005. Progress toward discerning the genetics of cleft lip. *Curr Opin Pediatr* 17:731-739.



- Lidral AC, Murray JC, Buetow KH, Basart AM, Schearer H, Shiang R, Naval A, Layda E, Magee K, Magee W. 1997. Studies of the candidate genes TGFB2, MSX1, TGFA, and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in the Philippines. *Cleft Palate Craniofac J* 34:1-6.
- Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, Doetschman T, Leysens NJ, Daack-Hirsch S, Semina EV, Johnson LR, Machida J, Burds A and others. 1998. Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans. *Am J Hum Genet* 63:557-568.
- Little J, Cardy A, Arslan MT, Gilmour M, Mossey PA. 2004a. Smoking and orofacial clefts: a United Kingdom-based case-control study. *Cleft Palate Craniofac J* 41:381-386.
- Little J, Cardy A, Munger RG. 2004b. Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. *Bull World Health Organ* 82:213-218.
- Loffredo LC, Souza JM, Freitas JA, Mossey PA. 2001. Oral clefts and vitamin supplementation. *Cleft Palate Craniofac J* 38:76-83.
- Lorente dM, Marcos-Gutiérrez, Pérez, Schoorlemmer, Ramírez, Magin, Vidal. 2000. Loss- and gain-of-function mutations show a polycomb group function for Ring1A in mice. *Development*. .
- Ludwig KU, Bohmer AC, Rubini M, Mossey PA, Herms S, Nowak S, Reutter H, Alblas MA, Lippke B, Barth S and others. 2014. Strong association of variants around FOXE1 and orofacial clefting. *J Dent Res* 93:376-381.
- Ludwig KU, Mangold E, Herms S, Nowak S, Reutter H, Paul A, Becker J, Herberz R, AlChawa T, Nasser E and others. 2012. Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci. *Nat Genet* 44:968-971.
- Ludwig KU, Wahle P, Reutter H, Paredes-Zenteno M, Munoz-Jimenez SG, Ortiz-Lopez R, Bohmer AC, Tessmann P, Nowak S, Nothen MM and others. 2013. Evaluating eight newly identified susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Mesoamerican population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 100:43-47.
- Lynch MD, Smith AJ, De Gobbi M, Flenley M, Hughes JR, Vernimmen D, Ayyub H, Sharpe JA, Sloane-Stanley JA, Sutherland L and others. 2012. An interspecies analysis reveals a key role for unmethylated CpG dinucleotides in vertebrate Polycomb complex recruitment. *Embo J* 31:317-329.
- Machida J, Yoshiura K, Funkhauser CD, Natsume N, Kawai T, Murray JC. 1999. Transforming growth factor-alpha (TGFA): genomic structure, boundary sequences, and mutation analysis in nonsyndromic cleft lip/palate and cleft palate only. *Genomics* 61:237-242.
- Mangold E, Ludwig KU, Birnbaum S, Baluardo C, Ferrian M, Herms S, Reutter H, de Assis NA, Chawa TA, Mattheisen M and others. 2010. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Nat Genet* 42:24-26.
- Marazita ML, Field LL, Cooper ME, Tobias R, Maher BS, Peanchitlertkajorn S, Liu YE. 2002. Nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in China: assessment of candidate regions. *Cleft Palate Craniofac J* 39:149-156.
- Marazita ML, Lidral AC, Murray JC, Field LL, Maher BS, Goldstein McHenry T, Cooper ME, Govil M, Daack-Hirsch S, Riley B and others. 2009. Genome scan, fine-mapping, and candidate gene analysis of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate reveals phenotype-specific differences in linkage and association results. *Hum Hered* 68:151-170.
- Marazita ML, Murray JC, Lidral AC, Arcos-Burgos M, Cooper ME, Goldstein T, Maher BS, Daack-Hirsch S, Schultz R, Mansilla MA and others. 2004. Meta-analysis of 13 genome scans reveals multiple cleft lip/palate genes with novel loci on 9q21 and 2q32-35. *Am J Hum Genet* 75:161-173.
- Marcano AC, Doudney K, Braybrook C, Squires R, Patton MA, Lees MM, Richieri-Costa A, Lidral AC, Murray JC, Moore GE and others. 2004. TBX22 mutations are a frequent cause of cleft palate. *J Med Genet* 41:68-74.
- Margueron R, Reinberg D. 2011. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469:343-349.
- Martinelli M, Masiero E, Carinci F, Morselli PG, Pezzetti F, Scapoli L. 2011. New evidence for the role of cystathionine beta-synthase in non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Oral Sci* 119:193-197.
- Martinelli M, Scapoli L, Palmieri A, Pezzetti F, Baciliero U, Padula E, Carinci P, Morselli PG, Carinci F. 2006. Study of four genes belonging to the folate pathway: transcobalamin 2 is involved in the onset of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat* 27:294.

- Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Carinci P, Stabellini G, Bisceglia L, Gombos F, Tognon M. 2001. C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P: a risk factor for mothers? *Am J Med Genet* 98:357-360.
- Martinez AM, Cavalli G. 2006. The role of polycomb group proteins in cell cycle regulation during development. *Cell Cycle* 5:1189-1197.
- Meyer KA, Werler MM, Hayes C, Mitchell AA. 2003. Low maternal alcohol consumption during pregnancy and oral clefts in offspring: the Slone Birth Defects Study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 67:509-514.
- Mitchell LE, Murray JC, O'Brien S, Christensen K. 2003. Retinoic acid receptor alpha gene variants, multivitamin use, and liver intake as risk factors for oral clefts: a population-based case-control study in Denmark, 1991-1994. *Am J Epidemiol* 158:69-76.
- Mohn F, Weber M, Rebhan M, Roloff TC, Richter J, Stadler MB, Bibel M, Schubeler D. 2008. Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol Cell* 30:755-766.
- Molloy AM, Daly S, Mills JL, Kirke PN, Whitehead AS, Ramsbottom D, Conley MR, Weir DG, Scott JM. 1997. Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations. *Lancet* 349:1591-1593.
- Montgomery ND, Yee D, Montgomery SA, Magnuson T. 2007. Molecular and functional mapping of EED motifs required for PRC2-dependent histone methylation. *J Mol Biol* 374:1145-1157.
- Moreno LM, Arcos-Burgos M, Marazita ML, Krahn K, Maher BS, Cooper ME, Valencia-Ramirez CR, Lidral AC. 2004. Genetic analysis of candidate loci in non-syndromic cleft lip families from Antioquia-Colombia and Ohio. *Am J Med Genet A* 125A:135-144.
- Moreno LM, Mansilla MA, Bullard SA, Cooper ME, Busch TD, Machida J, Johnson MK, Brauer D, Krahn K, Daack-Hirsch S and others. 2009. FOXE1 association with both isolated cleft lip with or without cleft palate, and isolated cleft palate. *Hum Mol Genet* 18:4879-4896.
- Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. 2009. Cleft lip and palate. *Lancet* 374:1773-1785.
- Mostowska A, Hozyasz KK, Biedziak B, Misiak J, Jagodzinski PP. 2010. Polymorphisms located in the region containing BHMT and BHMT2 genes as maternal protective factors for orofacial clefts. *Eur J Oral Sci* 118:325-332.
- Mostowska A, Hozyasz KK, Jagodzinski PP. 2006. Maternal MTR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate in the Polish population. *Clin Genet* 69:512-517.
- Munger RG, Romitti PA, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC, Hanson J. 1996. Maternal alcohol use and risk of orofacial cleft birth defects. *Teratology* 54:27-33.
- Murray JC, Nishimura DY, Buetow KH, Ardinger HH, Spence MA, Sparkes RS, Falk RE, Falk PM, Gardner RJ, Harkness EM and others. 1990. Linkage of an autosomal dominant clefting syndrome (Van der Woude) to loci on chromosome 1q. *Am J Hum Genet* 46:486-491.
- Narukawa T, Natsume N, Miura S, Kawai T. 1988. Decrease in cleft lip and palate by vitamin B12 in CL/FR mice. *Aichi Gakuin Dent Sci* 1:29-34.
- Nekrasov M, Klymenko T, Fraterman S, Papp B, Oktaba K, Kocher T, Cohen A, Stunnenberg HG, Wilm M, Muller J. 2007. Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes. *Embo J* 26:4078-4088.
- Nekrasov M, Wild B, Muller J. 2005. Nucleosome binding and histone methyltransferase activity of Drosophila PRC2. *EMBO Rep* 6:348-353.
- Nikopensius T, Ambrozaityte L, Ludwig KU, Birnbaum S, Jagomagi T, Saag M, Matuleviciene A, Linkeviciene L, Herms S, Knapp M and others. 2009. Replication of novel susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24 in Estonian and Lithuanian patients. *Am J Med Genet A* 149A:2551-2553.
- Norgard B, Puho E, Czeizel AE, Skriver MV, Sorensen HT. 2005. Aspirin use during early pregnancy and the risk of congenital abnormalities: a population-based case-control study. *Am J Obstet Gynecol* 192:922-923.
- Nuckolls GH, Shum L, Slavkin HC. 1999. Progress toward understanding craniofacial malformations. *Cleft Palate Craniofac J* 36:12-26.
- O'Carroll D, Erhardt S, Pagani M, Barton SC, Surani MA, Jenuwein T. 2001. The polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development. *Mol Cell Biol* 21:4330-4336.
- Olson EN. 2004. A decade of discoveries in cardiac biology. *Nat Med* 10:467-474.

- Parle-McDermott A, Pangilinan F, Mills JL, Kirke PN, Gibney ER, Troendle J, O'Leary VB, Molloy AM, Conley M, Scott JM and others. 2007. The 19-bp deletion polymorphism in intron-1 of dihydrofolate reductase (DHFR) may decrease rather than increase risk for spina bifida in the Irish population. *Am J Med Genet A* 143A:1174-1180.
- Pasini D, Cloos PA, Walfridsson J, Olsson L, Bukowski JP, Johansen JV, Bak M, Tommerup N, Rappsilber J, Helin K. 2010. JARID2 regulates binding of the Polycomb repressive complex 2 to target genes in ES cells. *Nature* 464:306-310.
- Pei L, Zhu H, Ren A, Finnell RH, Li Z. 2006. Genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G) and risk of orofacial defects and congenital heart defects in China. *Ann Epidemiol* 16:352-356.
- Peng JC, Valouev A, Swigut T, Zhang J, Zhao Y, Sidow A, Wysocka J. 2009. Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells. *Cell* 139:1290-1302.
- Pezzetti F, Martinelli M, Scapoli L, Carinci F, Palmieri A, Marchesini J, Carinci P, Caramelli E, Rullo R, Gombos F and others. 2004. Maternal MTHFR variant forms increase the risk in offspring of isolated nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat* 24:104-105.
- Pezzetti F, Scapoli L, Martinelli M, Carinci F, Bodo M, Carinci P, Tognon M. 1998. A locus in 2p13-p14 (OFC2), in addition to that mapped in 6p23, is involved in nonsyndromic familial orofacial cleft malformation. *Genomics* 50:299-305.
- Piunti A, Pasini D. 2011. Epigenetic factors in cancer development: polycomb group proteins. *Future Oncol* 7:57-75.
- Pontier DB, Gribnau J. 2011. Xist regulation and function explored. *Hum Genet* 130:223-236.
- Pradat P, Robert-Gnansia E, Di Tanna GL, Rosano A, Lisi A, Mastroiacovo P. 2003. First trimester exposure to corticosteroids and oral clefts. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 67:968-970.
- Prescott NJ, Malcolm S. 2002. Folate and the face: evaluating the evidence for the influence of folate genes on craniofacial development. *Cleft Palate Craniofac J* 39:327-331.
- Prezioso C, Orlando V. 2011. Polycomb proteins in mammalian cell differentiation and plasticity. *FEBS Lett* 585:2067-2077.
- Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchler MJ, Rubini M, Domann FE, Govil M, Christensen K, Bille C and others. 2008. Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet* 40:1341-1347.
- Rajion ZA, Alwi Z. 2007. Genetics of cleft lip and palate : a review. *Malays J Med Sci* 14:4-9.
- Ringrose L, Paro R. 2007. Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development* 134:223-232.
- Rojas-Martinez A, Reutter H, Chacon-Camacho O, Leon-Cachon RB, Munoz-Jimenez SG, Nowak S, Becker J, Herberz R, Ludwig KU, Paredes-Zenteno M and others. 2010. Genetic risk factors for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a Mesoamerican population: Evidence for IRF6 and variants at 8q24 and 10q25. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88:535-537.
- Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC. 1999. Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology* 59:39-50.
- Safra MJ, Oakley GP, Jr. 1975. Association between cleft lip with or without cleft palate and prenatal exposure to diazepam. *Lancet* 2:478-480.
- Sandler L, Lindsley DL, Nicoletti B, Trippa G. 1968. Mutants affecting meiosis in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 60:525-558.
- Sarma K, Margueron R, Ivanov A, Pirrotta V, Reinberg D. 2008. Ezh2 requires PHF1 to efficiently catalyze H3 lysine 27 trimethylation in vivo. *Mol Cell Biol* 28:2718-2731.
- Sassani R, Bartlett SP, Feng H, Goldner-Sauve A, Haq AK, Buetow KH, Gasser DL. 1993. Association between alleles of the transforming growth factor-alpha locus and the occurrence of cleft lip. *Am J Med Genet* 45:565-569.
- Satokata I, Maas R. 1994. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet* 6:348-356.
- Sauvageau M, Sauvageau G. 2010. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell* 7:299-313.



- Saxen I. 1975. Prolonged in vitro closure of the mouse secondary palate by salicylates. *Scand J Dent Res* 83:202-208.
- Scapoli L, Marchesini J, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci F, Palmieri A, Rullo R, Gombos F, Tognon M, Carinci P. 2005a. Study of folate receptor genes in nonsyndromic familial and sporadic cleft lip with or without cleft palate cases. *Am J Med Genet A* 132:302-304.
- Scapoli L, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci F, Bodo M, Tognon M, Carinci P. 2002. Linkage disequilibrium between GABRB3 gene and nonsyndromic familial cleft lip with or without cleft palate. *Hum Genet* 110:15-20.
- Scapoli L, Martinelli M, Pezzetti F, Palmieri A, Girardi A, Savoia A, Bianco AM, Carinci F. 2010. Expression and association data strongly support JARID2 involvement in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat* 31:794-800.
- Scapoli L, Palmieri A, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci P, Tognon M, Carinci F. 2005b. Strong evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the IRF6 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population. *Am J Hum Genet* 76:180-183.
- Scapoli L, Palmieri A, Martinelli M, Vaccari C, Marchesini J, Pezzetti F, Baciliero U, Padula E, Carinci P, Carinci F. 2006. Study of the PVRL1 gene in Italian nonsyndromic cleft lip patients with or without cleft palate. *Ann Hum Genet* 70:410-413.
- Scapoli L, Palmieri A, Pezzetti F, Carinci F, Marchesini J, Martinelli M, Delaiti G, Tognon M, Carinci P, Gombos F. 2004. Investigation of the W185X nonsense mutation of PVRL1 gene in Italian nonsyndromic cleft lip and palate patients. *Am J Med Genet A* 127:211.
- Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Martinelli M, Carinci P, Tognon M. 1997. Evidence of linkage to 6p23 and genetic heterogeneity in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Genomics* 43:216-220.
- Schafer AJ, Hawkins JR. 1998. DNA variation and the future of human genetics. *Nat Biotechnol* 16:33-39.
- Schuettengruber B, Cavalli G. 2009. Recruitment of polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. *Development* 136:3531-3542.
- Shaw GM, Lammer EJ. 1999. Maternal periconceptional alcohol consumption and risk for orofacial clefts. *J Pediatr* 134:298-303.
- Shaw GM, Lammer EJ, Zhu H, Baker MW, Neri E, Finnell RH. 2002. Maternal periconceptional vitamin use, genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G), and risk of spina bifida. *Am J Med Genet* 108:1-6.
- Shaw GM, Wasserman CR, Lammer EJ, O'Malley CD, Murray JC, Basart AM, Tolarova MM. 1996. Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor-alpha gene variants. *Am J Hum Genet* 58:551-561.
- Shaw GM, Zhu H, Lammer EJ, Yang W, Finnell RH. 2003. Genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G) and risk of orofacial and conotruncal heart defects. *Am J Epidemiol* 158:747-752.
- Shen X, Kim W, Fujiwara Y, Simon MD, Liu Y, Mysliwiec MR, Yuan GC, Lee Y, Orkin SH. 2009. Jumonji modulates polycomb activity and self-renewal versus differentiation of stem cells. *Cell* 139:1303-1314.
- Shen X, Liu Y, Hsu YJ, Fujiwara Y, Kim J, Mao X, Yuan GC, Orkin SH. 2008. EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol Cell* 32:491-502.
- Shepard TH, Brent RL, Friedman JM, Jones KL, Miller RK, Moore CA, Polifka JE. 2002. Update on new developments in the study of human teratogens. *Teratology* 65:153-161.
- Shi M, Christensen K, Weinberg CR, Romitti P, Bathum L, Lozada A, Morris RW, Lovett M, Murray JC. 2007. Orofacial cleft risk is increased with maternal smoking and specific detoxification-gene variants. *Am J Hum Genet* 80:76-90.
- Sing A, Pannell D, Karaïskakis A, Sturgeon K, Djabali M, Ellis J, Lipshitz HD, Cordes SP. 2009. A vertebrate Polycomb response element governs segmentation of the posterior hindbrain. *Cell* 138:885-897.
- Sozen MA, Suzuki K, Tolarova MM, Bustos T, Fernandez Iglesias JE, Spritz RA. 2001. Mutation of PVRL1 is associated with sporadic, non-syndromic cleft lip/palate in northern Venezuela. *Nat Genet* 29:141-142.

- Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. 1993. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 52:506-516.
- Stanier P, Moore GE. 2004. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1:R73-81.
- Stanislawska-Sachadyn A, Mitchell LE, Woodside JV, Buckley PT, Kealey C, Young IS, Scott JM, Murray L, Boreham CA, McNulty H and others. 2009. The reduced folate carrier (SLC19A1) c.80G>A polymorphism is associated with red cell folate concentrations among women. *Ann Hum Genet* 73:484-491.
- Stein JD, Hecht JT, Blanton SH. 1995. Exclusion of retinoic acid receptor and a cartilage matrix protein in non-syndromic CL(P) families. *J Med Genet* 32:78.
- Stoll C, Mengsteab S, Stoll D, Riediger D, Gressner AM, Weiskirchen R. 2004. Analysis of polymorphic TGFB1 codons 10, 25, and 263 in a German patient group with non-syndromic cleft lip, alveolus, and palate compared with healthy adults. *BMC Med Genet* 5:15.
- Studer M, Popperl H, Marshall H, Kuroiwa A, Krumlauf R. 1994. Role of a conserved retinoic acid response element in rhombomere restriction of Hoxb-1. *Science* 265:1728-1732.
- Stuppia L, Capogreco M, Marzo G, La Rovere D, Antonucci I, Gatta V, Palka G, Mortellaro C, Tete S. 2011. Genetics of syndromic and nonsyndromic cleft lip and palate. *J Craniofac Surg* 22:1722-1726.
- Surface LE, Thornton SR, Boyer LA. 2010. Polycomb group proteins set the stage for early lineage commitment. *Cell Stem Cell* 7:288-298.
- Suzuki Y, Jezewski PA, Machida J, Watanabe Y, Shi M, Cooper ME, Viet le T, Nguyen TD, Hai H, Natsume N and others. 2004. In a Vietnamese population, MSX1 variants contribute to cleft lip and palate. *Genet Med* 6:117-125.
- Takeuchi T, Watanabe Y, Takano-Shimizu T, Kondo S. 2006. Roles of jumonji and jumonji family genes in chromatin regulation and development. *Dev Dyn* 235:2449-2459.
- Takeuchi T, Yamazaki Y, Katoh-Fukui Y, Tsuchiya R, Kondo S, Motoyama J, Higashinakagawa T. 1995. Gene trap capture of a novel mouse gene, jumonji, required for neural tube formation. *Genes Dev* 9:1211-1222.
- Tang K, Fu D, Kotter S, Cotter RJ, Cantor CR, Koster H. 1995. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of immobilized duplex DNA probes. *Nucleic Acids Res* 23:3126-3131.
- Tongkobetch S, Suphapeetiporn K, Siriwan P, Shotelersuk V. 2008. Study of the poliovirus receptor related-1 gene in Thai patients with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Int J Oral Maxillofac Surg* 37:550-553.
- Trueba SS, Auge J, Mattei G, Etchevers H, Martinovic J, Czernichow P, Vekemans M, Polak M, Attie-Bitach T. 2005. PAX8, TITF1, and FOXE1 gene expression patterns during human development: new insights into human thyroid development and thyroid dysgenesis-associated malformations. *J Clin Endocrinol Metab* 90:455-462.
- Uslu VV, Petretich M, Ruf S, Langenfeld K, Fonseca NA, Marioni JC, Spitz F. 2014. Long-range enhancers regulating Myc expression are required for normal facial morphogenesis. *Nat Genet* 46:753-758.
- van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, van Amstel HK. 2000. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet* 24:342-343.
- van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ. 1998. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 62:1044-1051.
- van Rooij IA, Swinkels DW, Blom HJ, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. 2003. Vitamin and homocysteine status of mothers and infants and the risk of nonsyndromic orofacial clefts. *Am J Obstet Gynecol* 189:1155-1160.
- Vieira AR. 2008. Unraveling human cleft lip and palate research. *J Dent Res* 87:119-125.
- Vieira AR, Cooper ME, Marazita ML, Castilla EE, Orioli IM. 2008. Reduced folate carrier 1 (RFC1) is associated with cleft of the lip only. *Braz J Med Biol Res* 41:689-693.
- Vieira AR, Murray JC, Trembath D, Orioli IM, Castilla EE, Cooper ME, Marazita ML, Lennon-Graham F, Speer M. 2005. Studies of reduced folate carrier 1 (RFC1) A80G and 5,10-

- methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphisms with neural tube and orofacial cleft defects. *Am J Med Genet A* 135:220-223.
- Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Cooper ME, Marazita ML, Murray JC. 2003. MSX1 and TGFB3 contribute to clefting in South America. *J Dent Res* 82:289-292.
- Vintiner GM, Lo KK, Holder SE, Winter RM, Malcolm S. 1993. Exclusion of candidate genes from a role in cleft lip with or without cleft palate: linkage and association studies. *J Med Genet* 30:773-778.
- Voncken JW, Roelen BA, Roefs M, de Vries S, Verhoeven E, Marino S, Deschamps J, van Lohuizen M. 2003. Rnf2 (Ring1b) deficiency causes gastrulation arrest and cell cycle inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2468-2473.
- Wang, Song, Guo, Zhu. 2009. Relationship between genetic polymorphisms of RFC1 A80G and nonsyndromic cleft lip with or without palate. *Wei Sheng Yan Jiu*.
- Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. 2004. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431:873-878.
- Wehby GL, Murray JC. 2010. Folic acid and orofacial clefts: a review of the evidence. *Oral Dis* 16:11-19.
- Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. 1998. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 64:169-172.
- Werler MM, Hayes C, Louik C, Shapiro S, Mitchell AA. 1999. Multivitamin supplementation and risk of birth defects. *Am J Epidemiol* 150:675-682.
- Willis, Mehta. 1930. Studies in "pernicious anaemia" of pregnancy, I preliminary report. *Indian Journal of Medical Research*.
- Wong FK, Hagg U. 2004. An update on the aetiology of orofacial clefts. *Hong Kong Med J* 10:331-336.
- Woo CJ, Kharchenko PV, Daheron L, Park PJ, Kingston RE. 2010. A region of the human HOXD cluster that confers polycomb-group responsiveness. *Cell* 140:99-110.
- Wu HA, Bernstein E. 2008. Partners in imprinting: noncoding RNA and polycomb group proteins. *Dev Cell* 15:637-638.
- Wyszynski DF, Maestri N, Lewanda AF, McIntosh I, Smith EA, Garcia-Delgado C, Vinageras-Guarneros E, Wulfsberg E, Beaty TH. 1997. No evidence of linkage for cleft lip with or without cleft palate to a marker near the transforming growth factor alpha locus in two populations. *Hum Hered* 47:101-109.
- Xiong W, He F, Morikawa Y, Yu X, Zhang Z, Lan Y, Jiang R, Cserjesi P, Chen Y. 2009. Hand2 is required in the epithelium for palatogenesis in mice. *Dev Biol* 330:131-141.
- Yoo KH, Hennighausen L. 2012. EZH2 methyltransferase and H3K27 methylation in breast cancer. *Int J Biol Sci* 8:59-65.
- Yuan Q, Blanton SH, Hecht JT. 2011. Association of ABCA4 and MAFB with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Am J Med Genet A* 155A:1469-1471.
- Zhao W, Mosley BS, Cleves MA, Melnyk S, James SJ, Hobbs CA. 2006. Neural tube defects and maternal biomarkers of folate, homocysteine, and glutathione metabolism. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 76:230-236.
- Zuccherro TM, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, Caprau D, Christensen K, Suzuki Y, Machida J and others. 2004. Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *N Engl J Med* 351:769-780.

*7. PUBBLICAZIONI*  
*SCIENTIFICHE DI*  
*FRANCESCA CURA*

- 1: Martinelli M, Scapoli L, Cura F, Rodia MT, Ugolini G, Montroni I, Solmi R. **Colorectal cancer susceptibility: apparent gender-related modulation by ABCB1 gene polymorphisms.** J Biomed Sci. 2014 Sep 4;21(1):89.
- 2: Nouri N, Memarzadeh M, Carinci F, Cura F, Scapoli L, Nouri N, Jafary F, Sedghi M, Sadri L, Salehi M. **Family-based association analysis between nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate and IRF6 polymorphism in an Iranian population.** Clin Oral Investig. 2014 Sep 16.
- 3: Girardi A, Martinelli M, Cura F, Palmieri A, Carinci F, Sesenna E, Scapoli L. **RFC1 and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate: An association based study in Italy.** J Craniomaxillofac Surg. 2014 May 2. pii: S1010-5182(14)00144-9.
- 4: Palmieri A, Carinci F, Martinelli M, Pezzetti F, Girardi A, Cura F, Rubini C, Scapoli L. **Role of the MIR146A polymorphism in the origin and progression of oral squamous cell carcinoma.** Eur J Oral Sci. 2014 Jun;122(3):198-201.
- 5: Martinelli M, Girardi A, Cura F, Carinci F, Morselli PG, Scapoli L. **Evidence of the involvement of the DHFR gene in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate.** Eur J Med Genet. 2014 Jan;57(1):1-4.
- 6: Carinci F, Scapoli L, Girardi A, Cura F, Lauritano D, Nardi GM, Palmieri A. **Oral microflora and periodontal disease: new technology for diagnosis in dentistry.** Ann Stomatol (Roma). 2013 Jun 25;4(2):170-3. eCollection 2013. PubMed PMID: 23991267; PubMed Central PMCID: PMC3755798.
- 7: Danza M, Zollino I, Candotto V, Cura F, Carinci F. **Fibroblast behavior after titanium surfaces exposure.** Dent Res J (Isfahan). 2012 Dec;9(Suppl 2):S211-5.
- 8: Danza M, Zollino I, Candotto V, Cura F, Carinci F. **Titanium alloys (AoN) and their involvement in osseointegration.** Dent Res J (Isfahan). 2012 Dec;9(Suppl 2):S207-10.
- 9: Pozio A, Palmieri A, Girardi A, Cura F, Carinci F. **Titanium nanotubes stimulate osteoblast differentiation of stem cells from pulp and adipose tissue.** Dent Res J (Isfahan). 2012 Dec;9(Suppl 2):S169-74.
- 10: Pozio A, Palmieri A, Girardi A, Cura F, Carinci F. **Titanium nanotubes activate genes related to bone formation in vitro.** Dent Res J (Isfahan). 2012 Dec;9(Suppl 2):S164-8.

- 11: Cura F, Palmieri A, Girardi A, Martinelli M, Scapoli L, Carinci F. **Lab-Test(® 4: Dental caries and bacteriological analysis.** Dent Res J (Isfahan). 2012 Dec;9(Suppl 2):S139-41.
- 12: Rizzo R, Bortolotti D, Fredj NB, Rotola A, Cura F, Castellazzi M, Tamborino C, Seraceni S, Baldi E, Melchiorri L, Tola MR, Granieri E, Baricordi OR, Fainardi E. **Role of HLA-G 14bp deletion/insertion and +3142C>G polymorphisms in the production of sHLA-G molecules in relapsing-remitting multiple sclerosis.** Hum Immunol. 2012 Nov;73(11):1140-6.
- 13: Zollino I, Girardi A, Palmieri A, Cura F, Sollazzo V, Brunelli G, Carinci F. **Anatase-based implants nanocoating on stem cells derived from adipose tissue.** Implant Dent. 2012 Apr;21(2):118-23.